

Aus dem Institut für Lebensmittelchemie und  
Lebensmittelbiotechnologie der Justus Liebig Universität Gießen

# **Biotechnologische Gewinnung von Cyathan-Diterpenoiden**

Dissertation  
zur Erlangung des  
Naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
- Dr. rer. nat. -

des Fachbereichs Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Dipl.-Ing. Tian Shen**

geboren am 29. März 1982 in Hangzhou, Zhejiang

Gießen, Juni 2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Zorn

2. Gutachter: Prof. Dr. Marc Stadler

Prüfer: Prof. Dr. Gertrud Morlock

Prüfer: Prof. Dr. Richard Göttlich

Ich erkläre hiermit: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, Juni 2013

-----

Tian Shen





## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei all denjenigen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass ich das Projekt „Promotion“ in Angriff genommen, durchgeführt und jetzt auch zu Ende gebracht habe.

Mein besonderer Dank gilt

...meinem Doktorvater *Herrn Prof. Dr. Holger Zorn* für die Bereitstellung des Themas. Vielen Dank für Deine Geduld, Deine umsichtigen, konstruktiven und wertvollen Ratschläge und Deinen immerwährenden Optimismus, mit dem Du mich immer wieder motiviert hast.

...*Herrn Prof. Dr. Marc Stadler* für die fachspezifische Unterstützung und viele anregende Diskussionen, seine persönliche Betreuung meiner Laborarbeit während meines Aufenthalts in Dortmund und die schnelle Rückmeldung bei den vielen kleinen Fragen drumherum.

...*Frau Prof. Dr. Gertrud Morlock* für ihre freundliche Betreuung und Hilfsbereitschaft bei allen Arbeiten rund um die HPTLC.

...*Herrn Prof. Dr. Richard Göttlich* für den Beitritt zur Prüfungskommission.

...*Frau Dr. Heike Hausmann* am Institut für Organische Chemie für die NMR-Analysen und *Herrn Dr. Andreas Römpp* und *Herrn Dhaka Ram Bhandari* aus der Arbeitsgruppe von *Herrn Prof. Dr. Bernhard Spengler* (Analytische Chemie) für ihre Hilfe bei der massenspektrometrischen Analyse meiner Proben.

...den Mitarbeiter/innen der Firma InterMed Discovery, besonders *Frau Bärbel Köpcke*, *Frau Jana Moldenhauer*, *Herrn Stefan Heke*, *Frau Beata Schmieschek* und *Herrn Jens Bitzer* sowie der Arbeitsgruppe von *Herrn Prof. Dr.-Ing. Gerhard Schembecker* (TU Dortmund) für die gute Kooperation innerhalb des gemeinsamen Forschungsprojektes.

...meinen Kolleginnen und Kollegen *Dr. Stephanie Riemer*, *Katharina Schmidt*, *Dr. Andrea Bosse*, *Dr. Katrin Kunkel*, *Falk Amelung*, *Christiane Lauber*, *Alexander Heuger* und *Prof. Dr. Martin Rühl*, die mir während meiner praktischen Arbeiten vielseitig geholfen und mich immer unterstützt haben.

...allen fleißigen Korrekturlesern *Dr. Siegrun Mohring, Dr. Astrid Spielmeyer, Dr. Klaus Ermel, Marina Rusch, Theresia Schindler* und *Niklas Wolters* für die vielen wertvollen Tipps bei der Anfertigung meiner Dissertation.

...dem BMBF (Bundesministeriums für Bildung und Forschung) und CLIB2021 (Cluster industrielle Biotechnologie) für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsprojektes (FKZ 0315404C).

...der „Mensatruppe“, besonders *Adrian Imami, Ilya Galperin, Yanyan Zhang* für die tolle Zeit während der gemeinsamen Mittagspausen.

...natürlich meiner lieben Familie, für eure Geduld, Zuflucht und Unterstützung in guten und schlechten Zeiten.

将最诚挚的谢意送给我亲爱的家人，没有你们的耐心、支持与鼓舞，就没有今天的我！

## **Tagungsbeiträge**

**M. Stadler, J. Bitzer, B. Köpcke, S. Adelman, G. Schembecker, T. Shen, H. Zorn** (2010) Fermentation, Downstream Processing and Isolation of Biologically Active Terpenoids from Cultures of *Cyathus* and *Hericium* sp. (Basidiomycota). Workshop „Rote und Weiße Biotechnologie: Herstellung von Substanzen mittels Fermentationsverfahren, deren Aufarbeitung und Reinigung“ Materials Valley, Hanau, Deutschland

**T. Shen, M. Stadler, H. Zorn** (2011) Optimierung von Fermentationsverfahren für Basidiomyceten. Biotechnica, Hannover, Deutschland

**T. Shen, M. Stadler, G. Morlock, G. Schembecker, H. Zorn** (2012) Discovery of New Cyathane Diterpenoids and Other Secondary Metabolites from Cultures of *Hericium* and *Cyathus* species. The 18<sup>th</sup> Congress of the International Society for Mushroom Science, Peking, China



## Zusammenfassung

Basidiomyceten produzieren vielfältige biologisch aktive Sekundärmetabolite, unter anderem seltene niedermolekulare Terpenoide, welche ein enormes Potenzial in der pharmazeutischen Industrie besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu Cyathan-Diterpenoiden aus den Basidiomyceten-Arten *Cyathus striatus* (FU04405) und *Hericium erinaceus* (FU70034) durchgeführt. Letzterer ist als Produzent von verschiedenen Erinacinen bekannt. Die Erinacin C-Produktion war bei dem verwendeten Stamm stark substratabhängig. Das ZM1/2-Medium mit  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  Edamin® K erwies sich dafür als am besten geeignet. Die maximale Konzentration an Erinacin C betrug ca.  $257 \text{ mg L}^{-1}$  Medium mit einer Kultivierungsdauer von 9 Tagen. Die Produktion von Erinacin P war stark zeitabhängig. Die maximale Konzentration von  $184 \text{ mg L}^{-1}$  Medium wurde am Tag 3 erreicht. Eine UV-A-Bestrahlung während der Kultivierung wirkte sich sowohl auf das Biomassewachstum, als auch auf die Bildung der Erinacine negativ aus.

Des Weiteren wurden die Striatale A/B/C/D und die Striatine A/B aus Submerskulturen von *C. striatus* isoliert. Aus Submerskulturen von *H. erinaceus* wurden die Erinacine C/F/P, 4-Chlor-3,5-dimethoxybenzoesäure (neu entdeckter Metabolit), eine unbekannte Substanz mit der Summenformel  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_5$  und vier unbekannte Meroterpenoide  $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_7$ ,  $\text{C}_{42}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_{12}$ ,  $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}_7$  und  $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{NO}_7$  (neu entdeckte Metaboliten) isoliert. Aus den Fruchtkörpern von *H. erinaceus* wurden Hericenon B und Hericerin isoliert.

Mittels MALDI-MS-Imaging konnte nachgewiesen werden, dass die Striatale und Erinacine innerhalb eines Pellets lokalisiert sind. Durch den Einsatz einer kontinuierlich arbeitenden Rührwerkskugelmühle zum Zellaufschluss konnten die Produktausbeuten um 89% (Striatale A und B) bzw. um 53% (Erinacin C) gesteigert werden. Für die untersuchten Basidiomyceten erwies sich damit der Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle zur Freisetzung der Sekundärmetabolite als hocheffizient.

Darüber hinaus wurde ein indirekt kompetitiver ELISA zum Nachweis der Cyathan-Diterpenoide entwickelt. Verschiedene Einflussfaktoren auf den Assay wie pH-Wert, Temperatur, Dauer der Beschichtung sowie die Toleranz gegenüber

organischen Lösungsmitteln wurden untersucht. Die Kreuzreaktivitäten der Striatale A/C/D, der Striatine A/B und der Erinacine C/P gegen Striatal B wurden ebenfalls ermittelt. Zusätzlich wurde der hier etablierte ELISA in biologischen Proben zum Screening nach Cyathan-Derivaten eingesetzt. Dabei wurden Kreuzreaktivitäten in den Rohextrakten der Kulturüberstände aus Submerskulturen von *H. erinaceus* nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigte ein Rohextrakt aus Fruchtkörpern von *H. erinaceus* keine signifikante Antigen-Antikörper-Reaktion. Anhand der Wiederfindungsrate konnte eine hohe Sensitivität, eine ausreichende Genauigkeit und eine gute Korrelation des ELISA mit den HPLC-DAD-Messungen aufgezeigt werden.

Mittels HPTLC wurden vergleichbare Ergebnisse bezüglich Produktbildungskinetik wie mit Hilfe der HPLC erzielt. Die HPTLC bietet zusätzlich die Möglichkeit, die Sekundärmetabolite über die Bioautographie auf Bioaktivität zu überprüfen.

## Abstract

Fungi of the phylum Basidiomycota are well known to form a broad spectrum of biologically active secondary metabolites, especially low molecular weight compounds such as terpenoids. In the present work, two species, *Cyathus striatus* (FU04405) and *Hericium erinaceus* (FU70034), were studied, focusing on the rare cyathane diterpenoids formed in submerged cultures. *H. erinaceus* is a known producer of various erinacines. It was shown that the production of erinacine C strongly depended on the culture substrates. ZM1/2-medium with 0.5 g L<sup>-1</sup> Edamin® K proved to be the best medium for erinacine C production. The highest concentration was obtained on the 9<sup>th</sup> culture day (approximately 257 mg L<sup>-1</sup>). The production of erinacine P was strongly time dependent. While the concentration of erinacine P was decreasing, the erinacine C concentration increased steadily. The application of UV-A light showed negative effects on both, mycelium growth and secondary metabolite production.

Furthermore, secondary metabolites such as the striatals A, B, C, and D, and striatins A and B from submerged cultures of *C. striatus*, the erinacines C, F and P, 4-chloro-3,5-dimethoxy benzoic acid (novel natural product), an unknown metabolite with a sum formula of C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>, and four unknown meroterpenoids with sum formulas of C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>7</sub>, C<sub>42</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>, C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>7</sub> and C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>7</sub> (novel natural products) from submerged cultures of *H. erinaceus* could be purified by preparative HPLC.

Regarding the localization of the low molecular secondary metabolites in basidiomycetes, MALDI-MS-Imaging and different cell disruption techniques were applied. Thus it could be shown that cyathane diterpenoids are located within the mycelial pellets. The use of a glass bead mill for releasing secondary metabolites from basidiomycetes proved to be highly efficient. With this technique, the yields of striatals were increased up to 89% and of erinacine C up to 53%.

Additionally, an indirect competitive ELISA was developed for the detection of cyathane diterpenoids. Different factors influencing the ELISA were studied (e.g. pH, temperature, time of coating, tolerance of organic solvents). The cross reactivities of the striatals A, C and D, the striatins A and B, and the erinacines C and P against striatal B were determined. The presence of cyathane diterpenoids

in submerged cultures of *H. erinaceus* was proved by means of the developed indirect competitive ELISA. In contrast, it did not show cross reactivity with extracts from fruiting bodies, which implied the absence or the presence of only trace amounts of erinacines in fruiting bodies. A good correlation between data from the ELISA and the HPLC-DAD measurements could be shown.

Similar results for product formation kinetics, maximal UV absorption and mass spectrometric data could be obtained via HPTLC and HPLC-DAD. HPTLC allowed the additional analysis of biological activity of the analytes if combined with bioautographic techniques.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XIX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>23</b>
1.1 Naturstoffe .....	23
1.2 Zielsetzung .....	28
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>29</b>
2.1 Sekundärmetabolite aus <i>Cyathus striatus</i> .....	29
2.1.1 Isolierung und Charakterisierung der Sekundärmetabolite aus Submerskultur .....	29
2.1.1.1 Striatale .....	29
2.1.1.2 Striatine .....	30
2.2 Sekundärmetabolite aus <i>Hericium erinaceus</i> .....	36
2.2.1 Optimierung der Bildung von Erinacin C .....	36
2.2.1.1 Weglassversuche .....	36
2.2.1.2 Einfluss des Hafermehls .....	37
2.2.1.3 Einfluss von UV-A-Bestrahlung auf die Kultivierung .....	38
2.2.2 Isolierung und Charakterisierung der nicht-flüchtigen Sekundärmetabolite aus <i>H. erinaceus</i> .....	42
2.2.2.1 Identifizierte Sekundärmetabolite aus der Submerskultur .....	42
2.2.2.2 Identifizierte Sekundärmetabolite aus Fruchtkörpern von <i>H. erinaceus</i> .....	46
2.2.2.3 Produktbildungskinetik .....	48
2.2.2.4 UV/Vis-Spektren .....	51

2.2.2.5	Bioaktivität .....	51
2.2.2.6	Derivatisierung .....	53
2.2.2.7	HPTLC-MS/HPTLC-NMR .....	55
2.2.3	Untersuchung flüchtiger Inhaltsstoffe aus Submerskultur von <i>H. erinaceus</i> .....	56
2.3	Lokalisierung der Sekundärmetabolite .....	58
2.3.1	MALDI-MS-Imaging zur Lokalisierung der Sekundärmetabolite .....	58
2.3.1.1	Striatale in Submerskulturen aus <i>C. striatus</i> .....	58
2.3.1.2	Sekundärmetabolite aus Submerskulturen von <i>H. erinaceus</i> .....	61
2.3.1.3	Sekundärmetabolite aus Fruchtkörpern von <i>H. erinaceus</i> .....	62
2.3.1.4	Zusammenfassung .....	65
2.3.2	Zellaufschluss – <i>C. striatus</i> als Modellsystem .....	67
2.3.2.1	Aufschlussmedium .....	68
2.3.2.2	Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax .....	69
2.3.2.3	Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle .....	71
2.3.2.4	Lichtmikroskopie .....	75
2.3.3	Übertragung der optimierten Zellaufschlussbedingungen auf <i>H. erinaceus</i> .....	76
2.4	Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von Cyathan-Diterpenoiden .....	77
2.4.1	Produktion von Antikörpern .....	77
2.4.2	Stabilität der Striatale .....	78
2.4.3	Optimierung der Beschichtungsbedingungen .....	79
2.4.4	Optimierung der Blockierung .....	83
2.4.5	<i>Checkerboard</i> -Titerbestimmung .....	84
2.4.6	Zusammenfassung der optimierten ELISA-Bedingungen .....	86
2.4.7	Lagerstabilität der beschichteten und blockierten Mikrotiterplatten .....	86
2.4.8	Indirekter kompetitiver ELISA .....	87
2.4.8.1	Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln im kompetitiven ELISA .....	87
2.4.8.2	Spezifität des Assays / Kreuzreaktivitäten .....	88

2.4.8.3	Linearität des ELISA .....	90
2.4.8.4	Wiederfindung und Vergleich zur HPLC .....	91
2.4.8.5	Reproduzierbarkeit.....	93
2.4.8.6	Analyse von Kulturüberständen und Kulturextrakten .....	94
2.4.8.7	Analyse eines Rohextraktes aus Fruchtkörpern von <i>H. erinaceus</i> .....	97
2.4.9	Zusammenfassung des ELISA.....	98
2.5	Molekularphylogenetische Charakterisierung von <i>H. erinaceus</i> .....	99
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>103</b>
3.1	Biosyntheseweg .....	108
3.1.1	Natürliche Terpene.....	108
3.1.2	Biosynthetische Intermediate der Cyathan-Diterpene .....	111
3.2	Produktion von Cyathan-Diterpenen.....	114
3.2.1	Chemische Synthese .....	114
3.2.2	Biotechnologische Produktion .....	115
3.3	UV-A-Bestrahlung während der Submerskultivierung .....	118
3.4	Lokalisierung der Metabolite.....	120
3.4.1	MALDI-MS-Imaging von Basidiomyceten.....	120
3.4.2	Zellaufschluss .....	124
3.5	HPTLC vs. HPLC-DAD.....	127
3.6	ELISA .....	130
3.7	Sekundärmetabolite aus <i>H. erinaceus</i> .....	139
3.8	Molekularphylogenetische Charakterisierung von <i>H. erinaceus</i> .....	140
<b>4</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>141</b>
4.1	Mikroorganismen.....	141
4.2	Chemikalien.....	141
4.3	Geräte und sonstige Hilfsmittel.....	146
4.4	Kultivierung von Basidiomyceten.....	152
4.4.1	Nährmedienzusammensetzung .....	152

4.4.2	Kulturführung .....	156
4.5	Bestimmung der Kulturparameter .....	158
4.5.1	Biofeuchtmasse und Biotrockenmasse .....	158
4.5.2	pH-Wert.....	158
4.5.3	Proteingehalt – photometrisch .....	159
4.6	Probenvorbereitung für die Chromatographie .....	160
4.6.1	Extraktion der nicht-flüchtigen Inhaltsstoffe.....	160
4.6.2	Extraktion der flüchtigen Inhaltsstoffe .....	162
4.7	Zellaufschlussmethoden .....	163
4.7.1	Aufschlussmedium .....	163
4.7.2	Ultra-Turrax.....	164
4.7.3	Rührwerkskugelmühle.....	164
4.7.4	Übertragung des Zellaufschlusses auf <i>H. erinaceus</i> .....	166
4.8	Analytische Methoden .....	167
4.8.1	Analytische HPLC .....	167
4.8.1.1	Nachweis der Striatale A und B und Erstellung der Kalibriergeraden.....	167
4.8.1.2	Nachweis der Erinacine C und P und Erstellung der Kalibriergeraden.....	169
4.8.2	Präparative HPLC .....	171
4.8.2.1	Inhaltsstoffe von <i>C. striatus</i> .....	171
4.8.2.2	Inhaltsstoffe von <i>H. erinaceus</i> .....	173
4.8.3	Massenspektrometrie.....	174
4.8.4	HPLC-NMR .....	176
4.8.5	HPTLC .....	176
4.8.6	MALDI-Imaging .....	184
4.8.7	Gaschromatographie.....	188
4.9	ELISA .....	190
4.9.1	Zusammensetzung von Puffern und Lösungen.....	190

4.9.2	Produktion der Antikörper .....	192
4.9.3	Stabilität von Striatal B in verschiedenen Pufferlösungen .....	193
4.9.4	Durchführung des ELISA .....	195
4.9.5	Lagerstabilität der beschichteten und blockierten Mikrotiterplatten	196
4.9.6	Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln in einem kompetitiven ELISA.....	197
4.9.7	Spezifität / Kreuzreaktivität.....	197
4.9.8	Wiederfindung .....	198
4.9.9	Analyse der Kulturüberstände von <i>H. erinaceus</i> .....	199
4.9.10	Analyse der Extrakte aus Fruchtkörpern von <i>H. erinaceus</i> .....	200
4.10	Sequenzierung genomischer DNA .....	201
4.10.1	Isolierung genomischer DNA .....	201
4.10.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	201
4.10.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	202
4.10.4	Extraktion der genomischen DNA .....	203
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>205</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>207</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>225</b>
7.1	NMR-Analyse .....	225
7.2	HPLC-Chromatogramme .....	240

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Zeichen	Bezeichnung
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
A-OH	Antioxidantien
ATP	Adenosintriphosphat
BFM	Biofeuchtmasse
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Albumin Fraktion V aus Rinderserum
BTM	Biotrockenmasse
BW	Blindwert
COSY	Zweidimensionale NMR-Spektroskopie
DAD	Dioden-Array-Detektor
$\Delta E$	Extinktionsdifferenz
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOXP	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Weg
DPA	Diphenylamin
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSP	Downstreaming Prozess
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESI	Electro Spray Ionisation
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GC-FID	Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatograph mit massenselektivem Detektor
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
HER	<i>Hericium erinaceus</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
$hR_F$	Das 100-fache des Retentionsfaktors
HSA	Human Serum Albumin
ID	Innendurchmesser
IPP	Isopentenylpyrophosphat
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
KI	Kováts-Index
KÜ	Kulturüberstand
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MeOH	Methanol
MEP	Methylerythritol-4-phosphat-Weg
MS	Massenspektrometrie
MVA	Mevalonsäure-Weg

<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NK	Negativkontrolle
<i>p-</i>	<i>para-</i>
PAK	Primärantikörper
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RKM	Rührwerkskugelmühle
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RW	Referenzwert
SAK	Sekundärantikörper
SNL	Standard-Nähr-Lösung
SP	Soja-Pepton-Medium
<i>sp.</i>	Spezies
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TOF	Time of Flight
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
U min <sup>-1</sup>	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
Vis	Visible: sichtbares Licht



v/v	Volumenverhältnis
w/v	Gewicht zu Volumen-Verhältnis
YM	Hefe-Malz-Medium
ZM1/2-Medium	Zucker-Melasse-Medium



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Struktur des Farbstoffes Indigo. ....	24
Abbildung 2.1: Beispielchromatogramm der präp. HPLC zur Isolierung der Striatale, die in der Reihenfolge Striatal C, D, B und A eluieren. Detektionswellenlänge: 210 nm und 254 nm. ....	29
Abbildung 2.2: HPLC-DAD-Analyse des MeOH-Rohextraktes von <i>C. striatus</i> . Vergleich der Retentionszeiten mit den Referenzverbindungen Striatal A und Striatal B. ....	31
Abbildung 2.3: Vergleich der UV-Spektren der Substanzen im MeOH-Rohextrakt mit denen der Standards Striatal A und Striatal B mittels HPLC-DAD. ....	32
Abbildung 2.4: Vergleich der UV-Spektren der Striatale und Striatine mittels HPLC-DAD. ....	32
Abbildung 2.5: Vergleich des MeOH-Rohextraktes vor (schwarz) und nach dem Rühren (rot) mit MeOH für 40 h. ....	33
Abbildung 2.6: Trennung der Striatine mittels präparativer HPLC. ....	34
Abbildung 2.7: Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Erinacin C-Konzentration und Biofeuchtmasse bei Kulturabbruch (Tag 27). ....	37
Abbildung 2.8: Erinacin C-Bildung im Medium 6 (mit Hafermehl) und Medium 7 (ohne Hafermehl). ....	38
Abbildung 2.9: Biotrockenmassen der Kulturen unter Lichtausschluss und mit UV-A-Bestrahlung. ....	40
Abbildung 2.10: pH-Verlauf der Kulturen unter Lichtausschluss und mit UV-A-Bestrahlung. ....	40
Abbildung 2.11: Erinacin C-Produktion in den Kulturen unter Lichtausschluss. ....	41
Abbildung 2.12: Zusammenstellung der Erinacin C-Produktion und der Biotrockenmasse in den Kulturen unter Lichtausschluss. ....	41
Abbildung 2.13: 4-Chlor-3,5-dimethoxybenzoesäure ( $C_9H_9ClO_4$ ). ....	43
Abbildung 2.14: Struktur des isolierten Naturstoffs mit der Summenformel $C_{18}H_{21}NO_5$ . ....	43
Abbildung 2.15: Untersuchung der Produktbildungskinetik mittels HPTLC. Rohextrakte der Kulturüberstände im Medium 6 von Tag 1 bis Tag 9 (T1 - T9). Dokumentation des Chromatogramms bei 254 nm (a) und 366 nm (b). ....	49

Abbildung 2.16: Produktbildungskinetik der Erinacine P und C im Kulturüberstand im Medium 6 über neun Kulturtage mittels HPLC-DAD bei 210 nm.....	50
Abbildung 2.17: Bildung und Abbau von Substanz 2 ( $hR_F = 34$ ) im Kulturüberstand im Medium 6 (HPTLC). .....	50
Abbildung 2.18: UV/Vis-Spektren. A: Substanz 2, HPTLC. B: Erinacin P, HPLC-DAD.....	51
Abbildung 2.19: Bioaktivität der Sekundärmetabolite gegenüber <i>Vibrio fischeri</i> in 3-minütigen Aufnahmeintervallen. Tag 1 bis Tag 9 (1 bis 9), jeweils Doppelbestimmung. ....	52
Abbildung 2.20: HPTLC-Bioaktivitätsdetektion von Substanz 2 nach Inkubation mit <i>Vibrio fischeri</i> (links) und dokumentiert bei 254 nm (rechts). ....	53
Abbildung 2.21: HPTLC-Bioaktivitätsdetektion von Substanz 3 nach Inkubation mit <i>Vibrio fischeri</i> (links) und dokumentiert bei 366 nm (rechts). ....	53
Abbildung 2.22: HPTLC-Chromatogramme nach verschiedenen post-chromatographischen Derivatisierungen. Oben: Extrakt der Submerskultur (Tag 4). Rote Linie markiert Substanzen 2 und 3. Unten: Kontroll-Chromatogramme des Extrakts des Kulturmediums ohne Pilz. Extrakte vor den Derivatisierungen dokumentiert bei 254 nm, 366 nm und Weißlicht (Vis). ....	54
Abbildung 2.23: MS-Spektren ( $ESI^+$ ) der Substanz mit $hR_F = 34$ aus HPTLC-Platte. A: <i>H. erinaceus</i> (HER) Mycel-Rohextrakt an Kulturtag 4. B: Referenzsubstanz Erinacin P. $m/z$ 515,2 für $[M+Na]^+$ und 455,1 für $[M+Na-CH_3COOH]^+$ .....	55
Abbildung 2.24: Gaschromatogramm des Extrakts einer Submerskultur von <i>H. erinaceus</i> in SNL-Medium (DB-5-Säule). ....	56
Abbildung 2.25: Massenspektren der halogenierten Substanz mit $KI = 1641$ aus der Submerskultur von <i>H. erinaceus</i> (oben) und des Standards 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd mit $KI = 1620$ (unten). ....	57
Abbildung 2.26: Strukturvorschlag für den halogenierten Sekundärmetaboliten aus der Submerskultur von <i>H. erinaceus</i> : 4-Chlor-3,5-dimethoxybenzaldehyd. ....	57
Abbildung 2.27: Links: Pellets von <i>C. striatus</i> aus einer Submerskultur; rechts: Mikroskopische Aufnahme eines Pelletausschnittes. ....	59
Abbildung 2.28: Verteilungsbilder der Striatale A, B, C und D in einem Pellet aus Submerskultur von <i>C. striatus</i> dargestellt mittels MALDI-MS-Imaging. Links $[M+H]^+$ , Mitte $[M+Na]^+$ und rechts $[M+K]^+$ . Alle Angaben weisen eine Massengenauigkeit $< 2$ ppm und eine Pixelauflösung von 15 $\mu m$ auf. ....	60
Abbildung 2.29: Ausschnitt eines Pellets (20 $\mu m$ dick) aus Submerskultur von <i>H. erinaceus</i> unter dem Lichtmikroskop. ....	61

Abbildung 2.30: MALDI-MS-Imaging Verteilungsbilder der Erinacine in einem Pellet aus Submerskultur von <i>H. erinaceus</i> . Alle Angaben weisen eine Massengenauigkeit < 2 ppm und eine Pixelauflösung von 12 µm auf. ....	62
Abbildung 2.31: MALDI-MS-Imaging Verteilungsbilder der Sekundärmetabolite, die im Fruchtkörper von <i>H. erinaceus</i> vorkommen, in einem Pellet aus Submerskultur von <i>H. erinaceus</i> . Alle Angaben weisen eine Massengenauigkeit < 2 ppm und eine Pixelauflösung von 12 µm auf. ....	62
Abbildung 2.32: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Fruchtkörperausschnittes von <i>H. erinaceus</i> . Der rot markierte Bereich (10,0 mm x 7,5 mm) wurde analysiert. ....	63
Abbildung 2.33: Verteilungsbilder der Metabolite im Fruchtkörper von <i>H. erinaceus</i> mittels MALDI-MS-Imaging. Alle Angaben weisen eine Massengenauigkeit < 2 ppm und eine Pixelauflösung von 50 µm auf. ....	64
Abbildung 2.34: Verteilungsbilder der Erinacine im Fruchtkörper von <i>H. erinaceus</i> mittels MALDI-MS-Imaging. Alle Angaben weisen eine Massengenauigkeit < 2 ppm und eine Pixelauflösung von 50 µm auf. ....	65
Abbildung 2.35: Aufarbeitungsschema zum Zellaufschluss. ....	67
Abbildung 2.36: Striatal (A+B)-Konzentrationen nach Zellaufschluss. Vorhomogenisierung der Probe mittels Ultra-Turrax (15% BFM-Anteil, 15.000 rpm, 10 min) und anschließendem Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle (15% BFM-Anteil, 3.500 U min <sup>-1</sup> , 10 min, Glasperlen-Ø 0,5 mm) in Puffer und in Kulturüberstand (KÜ). Referenzwert: RW, direkte Extraktion nach Ernte. Kulturtag 12. ....	68
Abbildung 2.37: Proteinkonzentrationen vor und nach dem Zellaufschluss. Vorhomogenisierung der Probe mittels Ultra-Turrax (15% BFM-Anteil, 15.000 rpm, 10 min) und anschließendem Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle (15% BFM-Anteil, 3.500 U min <sup>-1</sup> , 10 min, Glasperlen-Ø 0,5 mm) in Puffer und in Kulturüberstand. Blau: Referenzwerte, direkte Extraktion nach Ernte. Kulturtag 12. ....	69
Abbildung 2.38: Striatal (A+B)-Konzentrationen nach dem Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax bei verschiedenen BFM-Anteilen (15.000 rpm, 15 min). Kulturtag 28. ....	70
Abbildung 2.39: Proteinkonzentrationen im Puffer vor und nach dem Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax bei verschiedenen BFM-Anteilen (15.000 rpm, 15 min). Kulturtag 28. ....	70
Abbildung 2.40: Striatal (A+B)- und Proteinkonzentrationen nach dem Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle in Abhängigkeit von verschiedenen Aufschlusszeiten (BFM: 6,3%, 3.500 U min <sup>-1</sup> , Glasperlen-Ø 0,5 mm). RW: nach Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax (BFM: 6,3%, 15.000 rpm, 15 min), jedoch vor Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle. Kulturtag 28. ....	72

Abbildung 2.41: Striatal (A+B)- und Proteinkonzentrationen nach dem Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle bei verschiedenen Drehzahlen (BFM: 5,5%, 20 min, Glasperlen-Ø 0,5 mm). RW: nach dem Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax (BFM: 5,5%, 15.000 rpm, 15 min), jedoch vor dem Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle. Kulturtag 28. ....	73
Abbildung 2.42: Striatal (A+B)- und Proteinkonzentrationen nach dem Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle (RKM) bei verschiedenen BFM-Anteilen (3.500 U min <sup>-1</sup> , Glasperlen-Ø 0,5 mm, 20 min). Referenzwerte, nach dem Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax (15.000 rpm, 15 min), jedoch vor dem Zellaufschluss mittels RKM. Kulturtag 28. ....	74
Abbildung 2.43: 20-fache Vergrößerung von aufgeschlossenem Mycel von <i>C. striatus</i> . Links: nach 5-minütiger Behandlung mittels Ultra-Turrax; Mitte: nach 15-minütiger Behandlung mittels Ultra-Turrax; rechts: nach 10-minütiger Behandlung mittels Rührwerkskugelmühle. ....	75
Abbildung 2.44: Wirksamkeit der angewendeten Zellaufschlussmethoden auf <i>H. erinaceus</i> . RW: direkte Extraktion nach Ernte. Ultra-Turrax: 15% BFM-Anteil, 15.000 rpm, 15 min. Rührwerkskugelmühle (RKM): 15% BFM-Anteil, 3.500 U min <sup>-1</sup> , Glasperlen-Ø 0,5 mm. Kulturtag 20. ....	76
Abbildung 2.45: MALDI-TOF-Massenspektren. Freies BSA (Trägerprotein) mit $m/z = 67$ kDa vor der Konjugatherstellung (links) und Striatal A/B-BSA-Konjugat mit $m/z = 75$ kDa nach der Konjugatherstellung (rechts). ....	77
Abbildung 2.46: Wiederfindung von Striatal B in DMSO/Puffer (1/1, v/v) mittels HPLC-DAD. ....	78
Abbildung 2.47: Auswahl des Beschichtungspuffers. Plattenmaterial: Maxisorp. NK: Negativkontrolle (Serum vor der Immunisierung). Temperatur: 24°C. Beschichtungsdauer: 16 h. Verdünnung der Primärantikörper: 1:100. ΔExtinktion: Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm. ....	79
Abbildung 2.48: Auswahl des Plattenmaterials. Beschichtungspuffer: PBS. NK: Negativkontrolle (Serum vor der Immunisierung). Temperatur: 24°C. Beschichtungsdauer: 16 h. Verdünnung der Primärantikörper: 1:100. ΔExtinktion: Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm. ....	80
Abbildung 2.49: Einfluss der Beschichtungstemperatur. Plattenmaterial: Maxisorp. Beschichtungspuffer: PBS. NK: Negativkontrolle (Serum vor der Immunisierung). Beschichtungsdauer: 16 h. Verdünnung der Primärantikörper: 1:100. ΔExtinktion: Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm. ....	81
Abbildung 2.50: Einfluss der Beschichtungsdauer. Plattenmaterial: Maxisorp. Beschichtungspuffer: PBS. NK: Negativkontrolle (Serum vor der Immunisierung). Temperatur: 24°C. Verdünnung der Primärantikörper: 1:100. ΔExtinktion: Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm. ....	82
Abbildung 2.51: Auswahl des Blockierungsproteins. Plattenmaterial: Maxisorp. Beschichtungspuffer: PBS. Temperatur: 24°C. Beschichtungsdauer: 16 h. NK: Negativkontrolle (Serum vor der Immunisierung). Verdünnung der	

---

Primärantikörper: 1:100. $\Delta$ Extinktion: Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm. ....	83
Abbildung 2.52: Titerbestimmung mittels <i>Checkerboard</i> -Titration. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung abzüglich der Negativkontrolle. Plattenmaterial: Maxisorp. Beschichtungspuffer: PBS. Temperatur: 24°C. Beschichtungsdauer: 16 h. Blockierungsprotein: 1%ige Gelatine. $\Delta$ Extinktion: Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm. ....	85
Abbildung 2.53: Lagerstabilität der beschichteten und blockierten Mikrotiterplatten. Dargestellt sind die Mittelwerte abzüglich der Negativkontrolle. Plattenmaterial: Maxisorp. Beschichtungspuffer: PBS. Temperatur: 24°C. Beschichtungsdauer: 16 h. Blockierungsprotein: 1%ige Gelatine. Lagerung bei 4°C im Dunkeln. $\Delta$ Extinktion: Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm. ....	87
Abbildung 2.54: Einfluss von Dimethylsulfoxid (DMSO), Acetonitril (ACN) und Methanol (MeOH) auf die Antigen-Antikörper-Reaktion. $\Delta$ Extinktion: Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm. ....	88
Abbildung 2.55: Beispiel für die Erstellung einer Kalibrierfunktion für Striatal B. A. Sigmoide Kurve. B. Linearisierung der sigmoiden Kurve durch eine Logit Funktion. $y = -0,745 \ln(x) - 2,4068$ , $R^2 = 0,9908$ , $IC_{50} = 39,5 \text{ ng mL}^{-1}$ . ....	89
Abbildung 2.56: Korrelation der ermittelten Striatal B-Konzentrationen in der Probenmatrix mittels ELISA (x-Achse) und HPLC-DAD (y-Achse). $R^2 = 0,9942$ . ....	92
Abbildung 2.57: Screening von Kulturüberständen von Submerskulturen von <i>H. erinaceus</i> im indirekten kompetitiven ELISA. Kontrolle: Kulturmedium ohne <i>H. erinaceus</i> ; Tag 1 bis Tag 9: Kulturmedium mit <i>H. erinaceus</i> ....	94
Abbildung 2.58: Screening von extrahierten Kulturüberständen aus Submerskulturen von <i>H. erinaceus</i> im indirekten kompetitiven ELISA. Kontrolle: Kulturmedium ohne <i>H. erinaceus</i> ; Tag 1 bis Tag 9: Kulturmedium mit <i>H. erinaceus</i> . ....	95
Abbildung 2.59: Analyse der Produktbildung mittels ELISA (berechnet aus Kalibrierung für Striatal B). ....	96
Abbildung 2.60: %B/B <sub>0</sub> -Werte der Rohextrakte aus Fruchtkörpern von <i>H. erinaceus</i> in Abhängigkeit von der Konzentration im indirekten kompetitiven ELISA. Blank: ohne Fruchtkörper-Rohextrakt. ....	97
Abbildung 2.61: DNA-Sequenz der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit flankierendem ITS-Bereich von <i>H. erinaceus</i> Fruchtkörpern. ....	99
Abbildung 2.62: DNA-Teilsequenz der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit flankierendem ITS-Bereich von <i>H. erinaceus</i> (FU70034) Submerskultur (IMD). ....	100
Abbildung 3.1: Cyathan-Grundgerüst (Enquist und Stoltz, 2009). ....	103

---

---

Abbildung 3.2: Die ersten Cyathan-Diterpenoide: Cyathin A <sub>3</sub> und Allocyathin B <sub>3</sub> (Allbutt <i>et al.</i> , 1971). .....	104
Abbildung 3.3: Konversion von Striatalen zu Striatinen (Anke <i>et al.</i> , 2002).....	105
Abbildung 3.4: Bisher charakterisierte Erinacine aus <i>H. erinaceus</i> , modifiziert nach den im Text genannten Literaturquellen. ....	107
Abbildung 3.5: Beteiligte Stoffwechselwege zur Bereitstellung der Bausteine für die Striatalsynthese, modifiziert nach Rabe (1989). GGPP: Geranylgeranyl-Pyrophosphat. ....	110
Abbildung 3.6: Biogenese der Erinacine, modifiziert nach Kenmoku <i>et al.</i> , 2000, Kenmoku <i>et al.</i> , 2001 und Kenmoku <i>et al.</i> , 2002. ....	113
Abbildung 3.7: Massenspektren. Links: Natriumaddukt von Striatal C ( $m/z = 469,21973$ ) und Kaliumaddukt von Striatal D ( $m/z = 469,19843$ ) mit $\Delta m/z = 0,02130$ Da; Rechts: Kaliumaddukt von Striatal A ( $m/z = 511,20920$ ) und Natriumaddukt von Striatal B ( $m/z = 511,23032$ ) mit $\Delta m/z = 0,02112$ Da. ....	122
Abbildung 3.8: Prinzipschema des indirekten ELISA. ....	130
Abbildung 4.1: Kalibriergerade zur Proteinbestimmung nach Bradford ( $y = 0,0226x + 0,4495$ ; $R^2 = 0,9966$ ). ....	159
Abbildung 4.2: Kalibriergerade für Striatal A. ....	168
Abbildung 4.3: Kalibriergerade für Striatal B. ....	169
Abbildung 4.4: Kalibriergerade für Erinacin C. ....	170
Abbildung 4.5: Kalibriergerade für Erinacin P. ....	171
Abbildung 4.6: Reaktion von 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl mit Antioxidantien (A-OH).....	178
Abbildung 4.7: Reaktion von Aldohexosen und Ketohehexosen mit Aminen und Diphenylamin. ....	179
Abbildung 4.8: Strukturformel von Primulin. ....	180
Abbildung 4.9: Kupplung von Echtblausalz B mit Phenolderivaten. ....	181
Abbildung 4.10: Reaktion eines Flavonoids mit Aluminiumchlorid unter Bildung eines fluoreszierenden Komplexes.....	182
Abbildung 4.11: Reaktion von Ninhydrin mit einem primären Amin. ....	182
Abbildung 4.12: Reaktion von Flavonol mit NEU's- Reagenz zu farbigem Komplex. ....	183

---



---

Abbildung 7.1: Striatal A, $^1\text{H}$ .....	225
Abbildung 7.2: Striatal A, $^{13}\text{C}$ .....	226
Abbildung 7.3: Striatal A, COSY.....	226
Abbildung 7.4: Striatal B, $^1\text{H}$ .....	227
Abbildung 7.5: Striatal B, $^{13}\text{C}$ .....	228
Abbildung 7.6: Striatal B, COSY.....	228
Abbildung 7.7: Striatal C, $^1\text{H}$ .....	229
Abbildung 7.8: Striatal C, $^{13}\text{C}$ .....	230
Abbildung 7.9: Striatal C, COSY.....	231
Abbildung 7.10: Striatal D, $^1\text{H}$ .....	232
Abbildung 7.11: Striatal D, $^{13}\text{C}$ .....	232
Abbildung 7.12: Striatal D, COSY.....	233
Abbildung 7.13: Striatin A, $^1\text{H}$ .....	234
Abbildung 7.14: Striatin A, $^{13}\text{C}$ .....	234
Abbildung 7.15: Striatin A, COSY.....	235
Abbildung 7.16: Striatin B, $^1\text{H}$ .....	236
Abbildung 7.17: Striatin B, $^{13}\text{C}$ .....	236
Abbildung 7.18: Striatin B, COSY.....	237
Abbildung 7.19: Erinacin P, $^1\text{H}$ .....	238
Abbildung 7.20: Erinacin P, $^{13}\text{C}$ .....	238
Abbildung 7.21: Erinacin P, COSY.....	239
Abbildung 7.22: HPLC-Chromatogramme (Offset 20%) zur Produktbildungskinetik. Ethylacetat-Rohextrakte aus Kulturüberständen von <i>H. erinaceus</i> (Tag 1 bis Tag 9). .....	240

---



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Identifizierte Striatale A, B, C und D. ....	30
Tabelle 2.2:	Identifizierte Strukturen der Striatine A und B. ....	35
Tabelle 2.3:	Identifizierte Substanzen aus Submerskulturen von <i>H. erinaceus</i> im Medium 6. ....	44
Tabelle 2.4:	Identifizierte Substanzen aus <i>H. erinaceus</i> in YM6,3-Medium. ....	46
Tabelle 2.5:	Isolierte Substanzen aus Fruchtkörpern von <i>H. erinaceus</i> . ....	47
Tabelle 2.6:	Substanzen aus den Fruchtkörpern von <i>H. erinaceus</i> mit Strukturvorschlag. ....	48
Tabelle 2.7:	m/z-Verhältnisse der Standards Striatal A und B bei der Analyse mittels MALDI-MS. ....	59
Tabelle 2.8:	Mittels MALDI-MS-Imaging nachgewiesene Sekundärmetabolite in Submerskultur und Fruchtkörpern von <i>H. erinaceus</i> . ....	66
Tabelle 2.9:	Titerbestimmung mittels <i>Checkerboard</i> -Titration. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung von $\Delta$ Extinktionen (Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm). PAK: Primärantikörper. Blau: $\Delta$ Extinktion $\approx$ 1; Rot: ausgewählte Titerbedingungen. ....	84
Tabelle 2.10:	Assayparameter ELISA. ....	86
Tabelle 2.11:	Kreuzreaktivitäten der strukturverwandten Substanzen. ....	90
Tabelle 2.12:	Linearitätsprüfung des ELISA. ....	90
Tabelle 2.13:	Aufstockung und Wiederfindung. ....	91
Tabelle 2.14:	Intra- und Interassay-Reproduzierbarkeit. ....	93
Tabelle 2.15:	Auswahl von Homologien der DNA-Sequenz der 5,8S Untereinheit mit flankierendem ITS-Bereich der Fruchtkörper zu verschiedenen Stämmen von <i>H. erinaceus</i> (Park <i>et al.</i> , 2004; Lu <i>et al.</i> , 2002; Brock <i>et al.</i> , 2009). ....	100
Tabelle 2.16:	Auswahl von Homologien der DNA-Sequenz der 5,8S Untereinheit mit flankierendem ITS-Bereich vom Stamm FU70034 zu verschiedenen Stämmen von <i>H. erinaceus</i> (Park <i>et al.</i> , 2004; Lu <i>et al.</i> , 2002; Brock <i>et al.</i> , 2009). ....	101

Tabelle 3.1:	Biosyntheseweg der Terpenoide von verschiedenen Pilzen und Pflanzen. ....	109
Tabelle 3.2:	Biotechnologische Gewinnung von Cyathan-Diterpenoiden. ....	116
Tabelle 3.3:	HPTLC vs. HPLC-DAD am Beispiel von Rohextrakten aus <i>H. erinaceus</i> . ....	129
Tabelle 3.4:	Beispiele zur Vorbehandlung der Mikrotiterplatte zur Gewährleistung direkter Bindung von Haptenen. ....	132
Tabelle 3.5:	Beispiele zu Anwendungstoleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln im ELISA. ....	136
Tabelle 4.1:	Untersuchte Basidiomyceten. ....	141
Tabelle 4.2:	Verwendete Chemikalien. ....	141
Tabelle 4.3:	Verwendete Geräte. ....	146
Tabelle 4.4:	Verwendete Trennsäulen. ....	151
Tabelle 4.5:	Standardnährlösung (SNL) modifiziert nach Sprecher und Hanssen (1982). ....	152
Tabelle 4.6:	Malzextrakt-Agar. ....	152
Tabelle 4.7:	Hefemalz-Medium (YM6,3). ....	153
Tabelle 4.8:	Sojapepton-Nährlösung (SP). ....	153
Tabelle 4.9:	Medienscreening zur Produktion von Erinacin C. ....	154
Tabelle 4.10:	ZM1/2-Medium mit Edamin <sup>®</sup> S (Medium 0). ....	154
Tabelle 4.11:	Medien für Weglassversuche. ....	155
Tabelle 4.12:	Spurenelementlösung für Nährmedien. ....	155
Tabelle 4.13:	50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH = 7,4. ....	163
Tabelle 4.14:	Übersicht über die untersuchten Parameter für den Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle. ....	165
Tabelle 4.15:	Systemparameter der MERCK HPLC-Anlage zur Striatal-Analytik. ....	167
Tabelle 4.16:	Gradient der MERCK HPLC zur Striatale-Analytik. ....	168
Tabelle 4.17:	Gradient der MERCK HPLC zur Erinacine-Analytik. ....	170

Tabelle 4.18:	Methodenparameter zur Auftrennung der Inhaltsstoffe aus dem Ethylacetat-Rohextrakt von <i>C. striatus</i> .....	172
Tabelle 4.19:	Gradient zur Auftrennung der Inhaltsstoffe aus dem Ethylacetat-Rohextrakt von <i>C. striatus</i> . ....	172
Tabelle 4.20:	Gradient zur Auftrennung der Inhaltsstoffe aus dem MeOH-Rohextrakt von <i>C. striatus</i> . ....	173
Tabelle 4.21:	Methodenparameter zur Auftrennung der Inhaltsstoffe aus <i>H. erinaceus</i> . ....	174
Tabelle 4.22:	Gradient zur Auftrennung der Inhaltsstoffe aus <i>H. erinaceus</i> . ....	174
Tabelle 4.23:	Methodenparameter zur Reinheitsüberprüfung bei IMD. ....	175
Tabelle 4.24:	Gradient zur Reinheitsüberprüfung sowie einer Massenbestimmung. ....	175
Tabelle 4.25:	Berechnete theoretisch exakte Massen der Standards. ....	185
Tabelle 4.26:	Cyathan-Diterpenoide mit den theoretisch berechneten exakten Massen. ....	186
Tabelle 4.27:	Sekundärmetabolite im Fruchtkörper von <i>H. erinaceus</i> mit den theoretisch berechneten exakten Massen. ....	187
Tabelle 4.28:	Geräteparameter GC-FID.....	188
Tabelle 4.29:	Geräteparameter GC-MS. ....	189
Tabelle 4.30:	0,1 M Kaliumacetat-Puffer (KOAc), pH 4,0. ....	190
Tabelle 4.31:	10 mM Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4. ....	190
Tabelle 4.32:	0,1 M Natriumcarbonat-Puffer pH 9,5. ....	190
Tabelle 4.33:	Waschpuffer, 10 mM PBST, pH 7,4. ....	191
Tabelle 4.34:	Blockierungsproteinlösung, 1%ige Gelatine.....	191
Tabelle 4.35:	Blockierungsproteinlösung, 5%iges Milchpulver. ....	191
Tabelle 4.36:	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Stammlösung. ....	191
Tabelle 4.37:	Färbelösung.....	192
Tabelle 4.38:	Rinderserumalbumin (BSA)-Stammlösung. ....	192

Tabelle 4.39:	Ablauf der Immunisierung.....	193
Tabelle 4.40:	pH-Werte der Pufferlösungen vor und nach Zugabe von DMSO.....	194
Tabelle 4.41:	Pipettierschema für eine Probe zur Präinkubation (1 mL Ansatz). ....	200
Tabelle 4.42:	ITS-Primer zur Amplifizierung der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit ITS-Bereich. ....	202

# 1 Einleitung

## 1.1 Naturstoffe

Der Begriff Naturstoffe beschreibt organisch-chemische Verbindungen mit biologischem Ursprung. Naturstoffe werden in allen lebenden Organismen, wie z. B. Tieren, Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen, aufgebaut oder ineinander umgewandelt.

In Bezug auf ihre Funktionen können im Wesentlichen zwei Gruppen von Naturstoffen unterschieden werden. Die eine Gruppe kommt ubiquitär vor, also sowohl in Tieren, Pflanzen, Pilzen als auch in Mikroorganismen. Es handelt sich um sog. primäre Metabolite, die im Rahmen des Primär- oder Grundstoffwechsels gebildet werden und für den Organismus zur Lebenserhaltung und zum Wachstum benötigt werden. Dazu gehören bestimmte Carbonsäuren, Aminosäuren, Proteine und Nukleinsäuren sowie deren Bausteine, Kohlenhydrate und Lipide.

Die zweite Gruppe, die sog. sekundären Metabolite, umfasst Verbindungen, die nur in bestimmten Organismengruppen oder gar nur in wenigen Arten aufgefunden werden. Diese sekundären Metabolite werden im Rahmen des Sekundärstoffwechsels gebildet und haben keine direkte Rolle in der Ökonomie der lebenden Zellen. Sie unterteilen sich in einzelne Substanzgruppen, deren wichtigste nachfolgend aufgeführt sind (Nuhn, 2006):

- Farbstoffe (Flavonoide, Anthocyanine, Betalaine) und Duftstoffe (ätherische Öle) der Blüten, mit der Funktion Insekten anzulocken,
- Polysaccharide (Cellulose, Chitin, Peptidoglykane), die als Zellwandbestandteile (Bakterien, Pflanzen, Pilze) oder Exogerüste (Insekten, Krebse, Pflanzen) einen mechanischen Schutz gewähren,
- Terpene, Steroide, Alkaloide oder Stoffwechselprodukte der Fettsäuren, die als Hormone oder Pheromone zur Regulation innerhalb des Organismus oder zwischen den Organismen (Sexualverhalten, Kommunikation) beitragen,

- Toxine, die Tiere zur Abwehr oder zum Angriff einsetzen bzw. Pflanzen oder Pilze ungenießbar machen oder antimikrobielle Abwehrstoffe, die von Pflanzen nach einer Infektion gebildet werden.

Einer der bekanntesten Farbstoffe ist Indigo (Abbildung 1.1), der blaue Farbstoff der Indigosträucher (*Indigofera*). Marco Polo (1254-1324) beschrieb als Erster die Herstellung von Indigo aus der Indigopflanze in Indien. 1897 stellte man so 6000 Tonnen natürlichen Indigos her (Schaefer, 2007). Mit natürlichem Indigo gefärbte Kleider waren sehr beliebt und früher ein Privileg der Obrigkeit. Heute wird Indigo hauptsächlich chemisch synthetisiert und gehört zu einem unverzichtbaren Farbstoff für „Blue Jeans“.

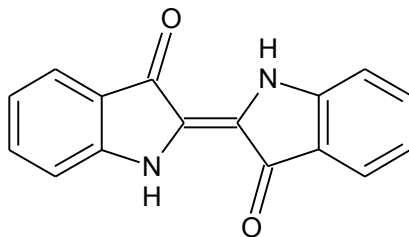


Abbildung 1.1: Struktur des Farbstoffes Indigo.

Naturstoffe haben den Menschen auf Grund ihrer vielseitigen biologischen Wirksamkeiten seit ältesten Zeiten interessiert. Als erstes Alkaloid konnte das Morphin, eines der stärksten bekannten natürlichen Schmerzmittel, aus dem Opium von dem Paderborner Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner 1805 isoliert werden. In den 1820er Jahren wurde Morphin als erster industriell hergestellter Naturstoff mit einem für die damalige Zeit außergewöhnlichen Reinheitsgrad von Merck (Darmstadt) produziert und kommerziell vermarktet (Habermehl *et al.*, 2008).

Mit der Entdeckung der Penicilline aus dem Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum* (früher als *Penicillium notatum* bekannt) durch Sir Alexander Fleming (1929) begann die Erschließung der Mikroorganismen als Quelle für neue Wirkstoffe und zugleich das Zeitalter der Antibiotika, welches in der zweiten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts seinen Höhepunkt erreichte. So wurde 1941 die



fermentative Produktion von Penicillin in den USA und in kleinerem Umfang 1943 in Deutschland, in den Farbwerken Hoechst, begonnen. Das Penicillin löste eine Revolution in der antibakteriellen Chemotherapie aus. Im Laufe der Jahre entdeckte man auch, dass die Natur eine ganze Reihe verschiedener Penicilline hervorbringt, die sich lediglich in den Seitenketten unterschieden. Sie dienten als Ausgangsstoffe für eine Vielzahl semisynthetischer Derivate. Spätestens seitdem sind Naturstoffe zu einer wichtigen Quelle für Leitstrukturen pharmazeutischer Wirkstoffe geworden (Bud, 2007; Schaefer, 2007).

Eine ganze Reihe von Wirkstoffen leiten sich heute von Naturstoffen ab. Ein Beispiel hierfür sind die als Medikamente weltweit meistverkauften Statine, welche das Enzym 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) inhibieren und zur Senkung des Blut-Cholesterinspiegels beitragen. Atorvastatin (erster Hersteller Pfizer 1986, vertrieben als Lipitor® oder Sortis®) erreichte im Jahr 2011 auf dem US-Markt einen Umsatz von 7,7 Milliarden Dollar und stand bis 2011 schon mehrere Jahre auf Platz 1 der Top 200 Drogen (Bartholow, 2012). Wichtige Vertreter der Statin-Derivate sind z. B. Mevastatin, Lovastatin, Simvastatin, Pravastatin, Fluvastatin und Cerivastatin. Mevastatin (früher Compactin), wurde in den 70er Jahren aus *Penicillium citrinum* isoliert und war das Erste aller entdeckten Statine (Endo *et al.*, 1976a, b). Lovastatin (früher Mevinolin) wurde im Jahr 1980 aus *Aspergillus terreus* isoliert und später in *Monascus ruber* gefunden (Alberts *et al.*, 1980; Alberts, 1988; Manzoni *et al.*, 1999). Die industrielle Produktion begann 1980 bei Merck durch Fermentation eines Stamms von *A. terreus*. Durch weitere Optimierung und den Einsatz der Mutagenesetechnik konnte 1997 die Lovastatin-Konzentration auf 7 bis 8 g L<sup>-1</sup> erhöht werden. Weiterhin erfolgte die Produktion von z. B. Pravastatin durch Biotransformation des Mevastatins durch *Streptomyces carbophilus*. Simvastatin, das zweitmeist verkaufte Statin, wird durch einen semisynthetischen Prozess mit einer chemischen Modifikation der Seitenkette vom Naturstoff Lovastatin gewonnen. Atorvastatin und Fluvastatin werden vollsynthetisch hergestellt (Manzoni und Rollini, 2002). Außer in *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* und *Monascus sp.* wurde auch im Basidiomyceten (Ständerpilz) *Pleurotus ostreatus*

die Produktion der Statine beobachtet (Alarcon *et al.*, 2003; Alarcon und Aguila, 2006).

Das Phylum der Basidiomyceten umfasst die am höchsten entwickelten Pilze und stellt eine ergiebige Quelle für Naturstoffe mit hohem Anwendungspotential in der Weißen Biotechnologie dar. Bisher sind ca. 30.000 Arten von Basidiomyceten bekannt (Kirk *et al.*, 2008). Sie sind in der Lage, auf komplexen Substraten, wie z. B. Holz, eine Vielzahl sekundärer Metabolite zu produzieren.

Einerseits haben Basidiomyceten eine bemerkenswerte Fähigkeit, hochmolekulare Substanzen, unterschiedliche Enzyme, wie z. B. Laccasen, Lipasen, Peroxidasen, Peptidasen und Oxygenasen zu produzieren (Perez *et al.*, 2002; Erjavec *et al.*, 2012). Diese einzigartigen extrazellulären Enzyme können Anwendung als Biokatalysatoren oder als Zusatzstoffe in der Kosmetik-, der Lebensmittel-, der Chemie- und der Pharma-Industrie finden. Ein Beispiel hierfür ist die neuartige Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*, die das Sesquiterpen (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton oxidiert (Fraatz *et al.*, 2009a, b). Die von Basidiomyceten produzierten Polysaccharide, wie z. B.  $\beta$ -1,3-Glucane und  $\beta$ -1,6-Glucane, wurden intensiv als Immunmodulatoren oder Antitumorstoffe von vielen Wissenschaftlern untersucht (Roupas *et al.*, 2012; Paterson, 2006; Yang und Zhang, 2009; Zhang *et al.*, 2007; Lindequist *et al.*, 2005).

Andererseits sind Basidiomyceten in der Lage, niedermolekulare Naturstoffe, wie z. B. Aromen, zu produzieren. Aus *Nidula niveo-tomentosa* konnte das Himbeerketon gewonnen werden (Böker *et al.*, 2001). Das blumige Aroma  $\beta$ -Ionon konnte durch *Mycetinis scorodonius* (früher *Marasmius scorodonius*) und *Trametes versicolor* aus  $\beta$ -Carotin gebildet werden (Zorn *et al.*, 2003). Basidiomyceten sind potentielle Quellen zur Gewinnung von natürlichen Aromen und haben besondere Bedeutung für die Lebensmittelindustrie (Lomascolo *et al.*, 1999). Gegenüber den chemisch synthetisierten Aromen hat dies wesentliche Vorteile: Die Herstellungsprozesse sind umweltfreundlicher und es wird auf natürlich nachwachsende Rohstoffe zurückgegriffen. Diese Produkte werden vom Verbraucher bevorzugt.

Neben den natürlichen Aromen sind die Basidiomyceten ebenfalls „Fabriken“ von verschiedenen Terpenoiden (Ayer und Browne, 1981; Schöffler und Anke, 2009). Die breiten biologischen Eigenschaften natürlicher Terpene und das Potential, in der pharmazeutischen Industrie zum Einsatz zu kommen (Antibiotika, Immunsuppressiva, Enzym-Inhibitoren, antitumorale und antivirale Wirkstoffe etc.), haben dazu geführt, dass ein großes Interesse an diesen Verbindungen in der Forschung besteht. Aus *Clitocybe illudens* können z. B. die Sesquiterpene Illudin A und B, aus *Coprinopsis episcopalis* die Illudine I, I<sub>2</sub> und J<sub>2</sub>, isoliert werden, welche antibakterielle und antitumorale Aktivität zeigen (Arnone *et al.*, 1991; Gonzalez Del Val *et al.*, 2003). Aus *Pleurotus multilus* und *Clitopilus (Pleurotus) passeckerianus* wurde bereits Anfang der 1950er Jahre der Wirkstoff Pleuromutilin mit antibakterieller Aktivität gegen grampositive Erreger isoliert (Kavanagh *et al.*, 1951). Die Herstellung von semisynthetischen Derivaten aus diesem tricyclischen Diterpen erlaubte eine Entwicklung als Arzneimittel. Retapamulin (vertrieben als Altargo<sup>TM</sup>) ist der erste Wirkstoff dieser Gruppe, der in der Humanmedizin zur Kurzzeitbehandlung von oberflächlichen Hautinfektionen wie Impetigo<sup>1</sup> angewendet wird (Daum *et al.*, 2007; Jacobs, 2007).

Aus *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. wurden eine Reihe von Diterpenoiden aus der Gruppe der Erinacine isoliert, wie z. B. Erinacin A, B und C. Von diesen ist bekannt, dass sie die Synthese des *Nerve Growth Factor* (NGF) stimulieren (Kawagishi *et al.*, 1994). Alle biologisch aktiven Terpene verfügen potentiell über eine große marktwirtschaftliche Bedeutung.

---

<sup>1</sup> Eine hochinfektiöse bakterielle Hauterkrankung mit einem Häufigkeitsgipfel bei Kindern und Neugeborenen.

## 1.2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Basidiomyceten: *Cyathus striatus* (Huds.) Willd. und *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers..

Bei *C. striatus* sollten die Sekundärmetabolite vom Striatal-Typus, sog. Cyathan-Diterpenoide, aus Submerskulturen isoliert werden. Die isolierten Reinstoffe sollten als Standardsubstanzen für eine quantitative Analytik sowie für die Etablierung eines Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) dienen. Die gegen Striatal A/B (1/1) hergestellten polyklonalen Antikörper sollten bezüglich ihrer Kreuzreaktivitäten und zur Detektion strukturverwandter Substanzen (u. a. Striatal C/D, Striatin A/B und Erinacin C/P) getestet werden.

Bei *H. erinaceus* sollten die Sekundärmetabolite sowohl aus Submerskultur, als auch aus Fruchtkörpern untersucht werden. Zum einen sollte die Produktkonzentration von Erinacin C aus Submerskultur optimiert werden. Zum anderen sollten die Sekundärmetabolite chromatographisch isoliert und charakterisiert werden. Die Produktbildungskinetik über den Kulturverlauf hinweg sollte mittels HPLC, HPTLC sowie ELISA ermittelt und miteinander verglichen werden. In Erweiterung dieser Arbeiten sollte noch die Einsatzbarkeit einer HPTLC-NMR-Kopplung zur Strukturaufklärung eines Naturstoffes überprüft werden.

Zur Optimierung von Downstreaming Prozessen (DSP) und damit der Zugänglichkeit im industriellen Maßstab sollte die Lokalisierung der Sekundärmetabolite aus Basidiomyceten am Beispiel von *H. erinaceus* und *C. striatus* untersucht werden.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Sekundärmetabolite aus *Cyathus striatus*

#### 2.1.1 Isolierung und Charakterisierung der Sekundärmetabolite aus Submerskultur

##### 2.1.1.1 Striatale

Die Isolierung der Inhaltsstoffe aus *C. striatus* wurde während eines Aufenthalts bei InterMed Discovery (IMD, Dortmund) durchgeführt.

Aus 2,2 L Schüttelkolbenkultur (Kulturtag 12) wurden 4,3 g Rohextrakt aus 179,4 g Biofeuchtmasse (BFM) gewonnen (4.6.1). Die Trennung der Inhaltsstoffe erfolgte mittels präparativer HPLC (4.8.2.1). In Abbildung 2.1 ist ein Beispielchromatogramm der präparativen Trennung dargestellt.

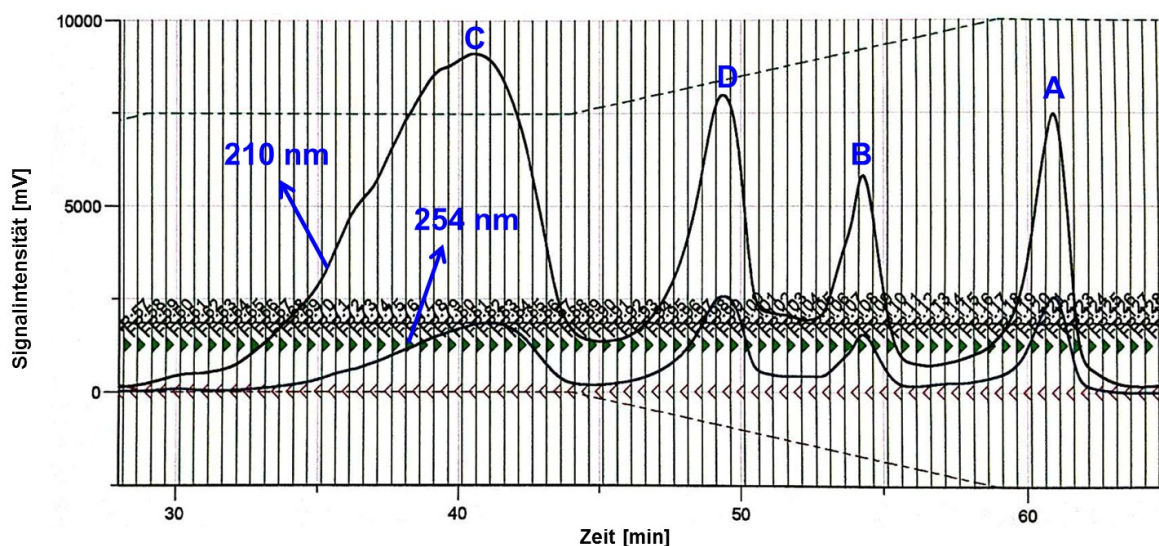


Abbildung 2.1: Beispielchromatogramm der präp. HPLC zur Isolierung der Striatale, die in der Reihenfolge Striatum C, D, B und A eluieren. Detektionswellenlänge: 210 nm und 254 nm.

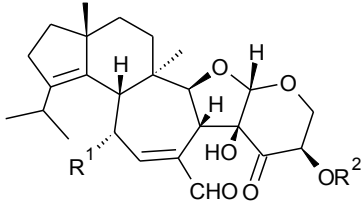
Striatum A und B wurden mit einer Reinheit von > 95% gewonnen und anhand der Referenzsubstanzen eindeutig identifiziert. Für Striatum C und D wurde wegen der

nicht ausreichenden Reinheit (ca. 80%) eine weitere Aufreinigung mittels präparativer HPLC durchgeführt. Da für die Striatale C und D keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen, wurden die beiden isolierten Substanzen mittels NMR identifiziert. Die gewonnenen Substanzen (Tabelle 2.1) wurden zum einen als Standardsubstanzen für andere Projektpartner bereitgestellt, zum anderen als Antigene (Striatale A und B) für die Produktion von Antikörpern verwendet (4.9.2).

Tabelle 2.1: Identifizierte Striatale A, B, C und D.

Substanz	Summenformel	Molekulargewicht	Menge
		[g mol <sup>-1</sup> ]	[mg]
Striatal A	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O <sub>7</sub>	472,57	90,8
Striatal B	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	488,57	94,2
Striatal C	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	446,53	530,5
Striatal D	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	430,53	281,1



Striatal A: R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = COCH<sub>3</sub>

Striatal B: R<sup>1</sup> = OH, R<sup>2</sup> = COCH<sub>3</sub>

Striatal C: R<sup>1</sup> = OH, R<sup>2</sup> = H

Striatal D: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H

### 2.1.1.2 Striatine

Es ist bekannt, dass Striatale in Anwesenheit von Methanol (MeOH) in Striatine umgewandelt werden (Anke *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurde die Biomasse des Pilzes *C. striatus* mit MeOH extrahiert.

Aus 1,6 L Schüttelkolbenkultur von *C. striatus* (14 Kulturtage) wurden ca. 250 g Biofeuchtmasse gewonnen, die mit 750 mL Methanol für 18 h extrahiert wurden. Nach der Abtrennung des Mycels und dem Entfernen des Lösungsmittels konnten

6,8 g Rohextrakt gewonnen werden. Die Messung mittels HPLC-DAD ergab jedoch, dass im Rohextrakt trotz der Extraktion mit MeOH Striatale und nicht die gewünschten Striatine vorlagen. Die Retentionszeiten der Peaks bei 13,0 min und 14,9 min im MeOH-Rohextrakt stimmten exakt mit denen der Standardsubstanzen Striatal A und B überein (Abbildung 2.2). Außerdem entsprachen die UV-Spektren der Peaks den Spektren der Standards (Abbildung 2.3) und unterscheiden sich von denen der Striatine (Abbildung 2.4).

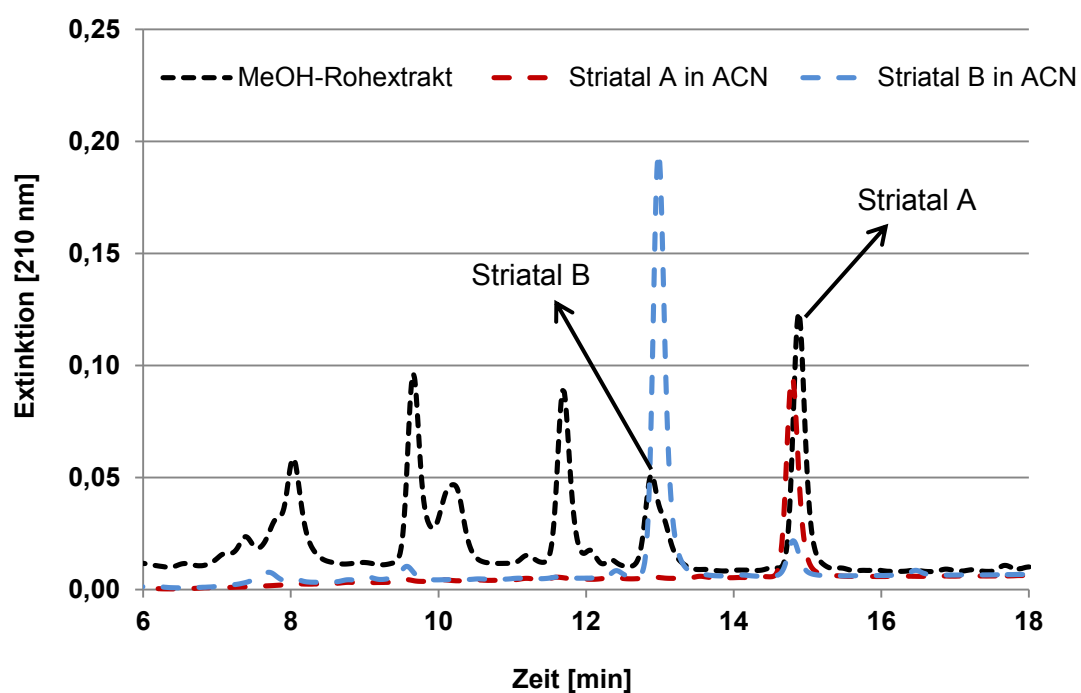


Abbildung 2.2: HPLC-DAD-Analyse des MeOH-Rohextraktes von *C. striatus*. Vergleich der Retentionszeiten mit den Referenzverbindungen Striatal A und Striatal B.

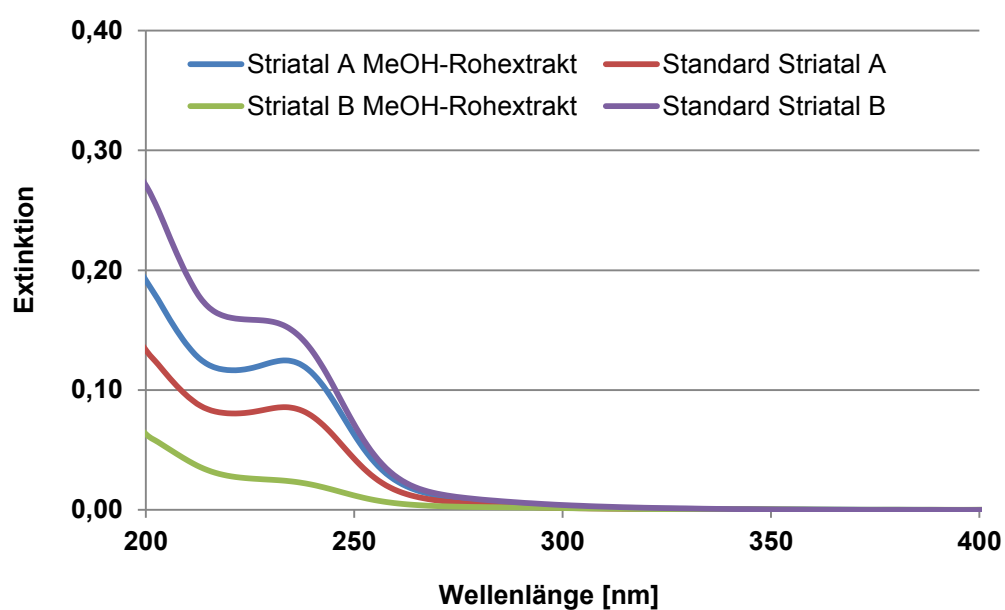


Abbildung 2.3: Vergleich der UV-Spektren der Substanzen im MeOH-Rohextrakt mit denen der Standards Striat A und Striat B mittels HPLC-DAD.

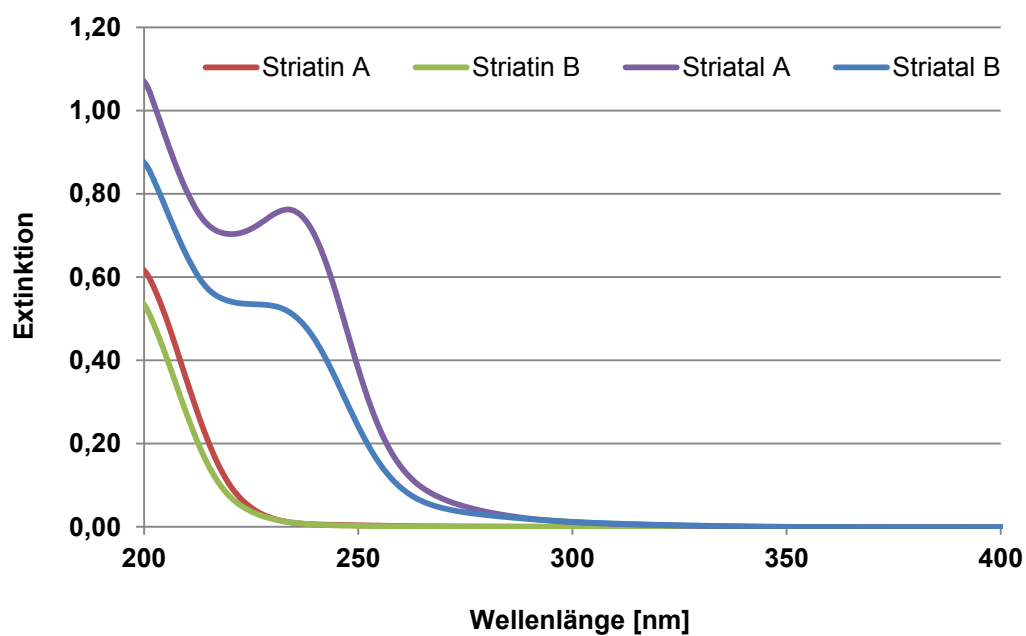


Abbildung 2.4: Vergleich der UV-Spektren der Striatale und Striatine mittels HPLC-DAD.



Die Bildung von Striatinen aus Striatalen ist reversibel. Der Wasseranteil der Biofeuchtmasse sowie andere Sekundärmetabolite, die zu einem Absinken des pH-Wertes führen, könnten eine Ursache dafür sein, dass es in MeOH nicht zu der gewünschten Striatin-Bildung kam.

Wurde der bis zur Trockne eingedampfte Rohextrakt erneut mit MeOH versetzt (40 h Rühren), wies das HPLC-Chromatogramm ein anderes Profil auf (Abbildung 2.5). Striatin A coeluierte mit Striatin B, wobei die eindeutige Zuordnung durch den Vergleich des UV-Spektrums der jeweiligen Peaks gewährleistet werden konnte.

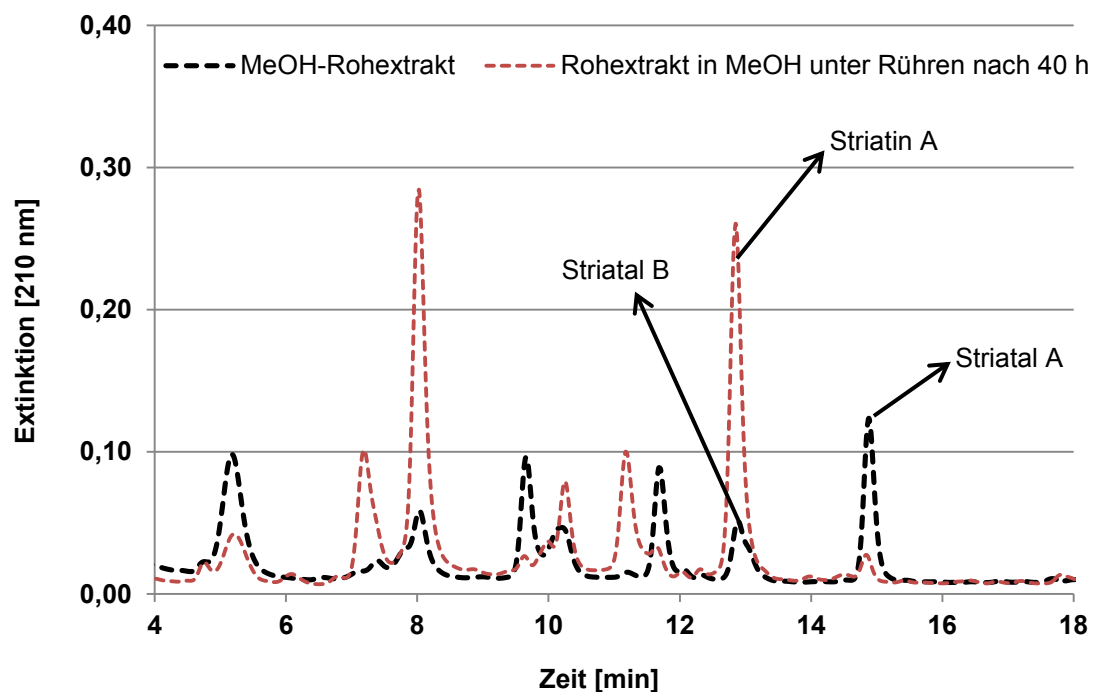


Abbildung 2.5: Vergleich des MeOH-Rohextraktes vor (schwarz) und nach dem Rühren (rot) mit MeOH für 40 h.

Der Rohextrakt (64,0 mg) wurde nach der zweiten MeOH-Behandlung mittels präparativer HPLC aufgetrennt (Abbildung 2.6).

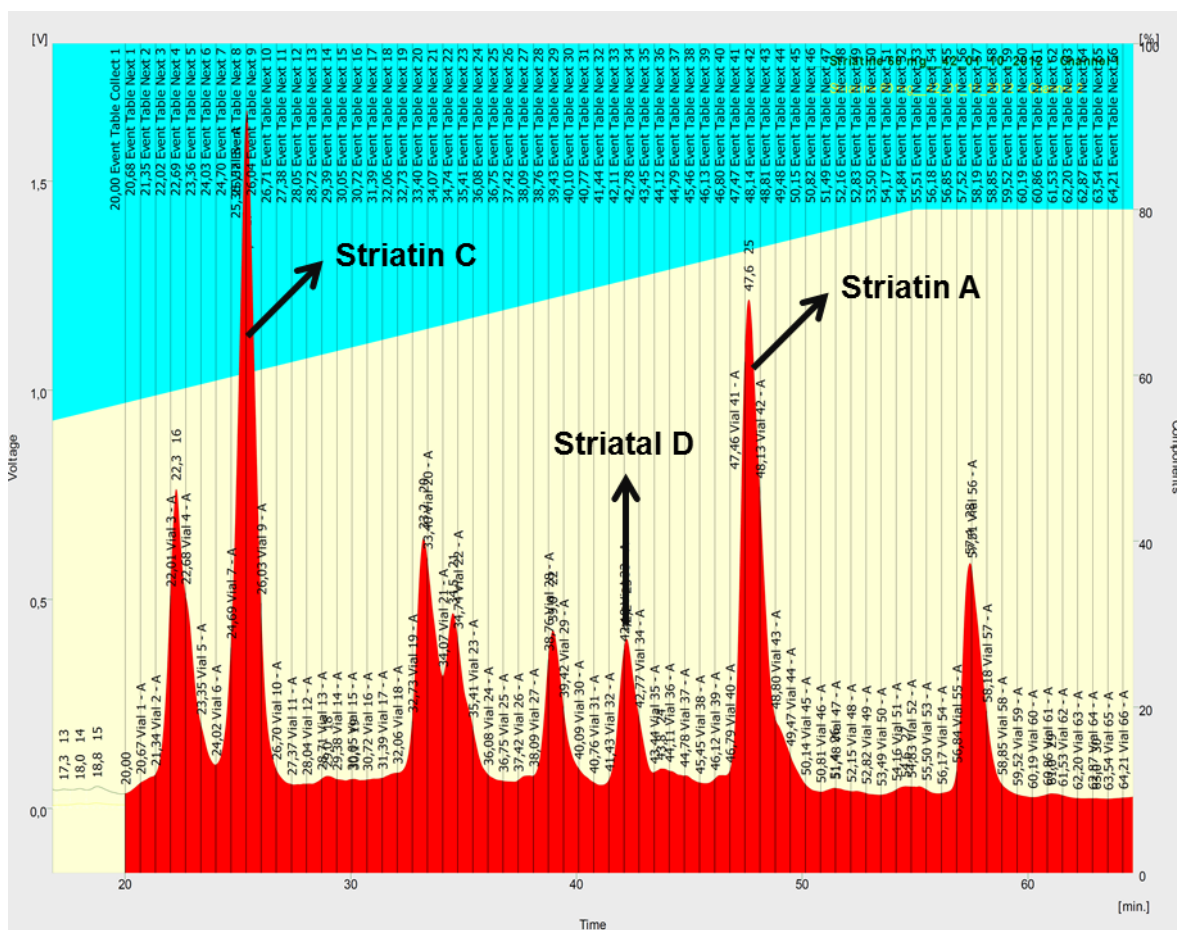


Abbildung 2.6: Trennung der Striatine mittels präparativer HPLC.

Es wurden drei Fraktionen mit einer hohen Reinheit isoliert. Die Massen wurden mit Hilfe des ESI-positiv-Modus (MicroTOF) ermittelt und die Strukturen wurden mittels NMR (in Kooperation mit dem Institut für organische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen) aufgeklärt. Die NMR-Analytik wurde zunächst in  $\text{CDCl}_3$  durchgeführt und ergab die Verbindungen Striatin A, C und D ( $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Verschiebungsdaten sowie NMR-Spektren siehe Anhang 7.1).

Wurde die Analyse in  $\text{MeOH-d}_4$  durchgeführt, konnte die Striatin-Form nachgewiesen werden. Striatin A lag mit einer ausreichenden Reinheit vor, um die

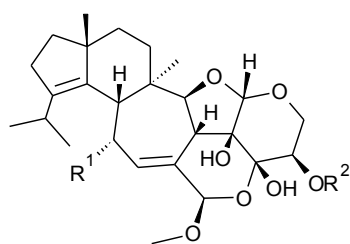
Struktur eindeutig aufzuklären. Beim Striatin C wurden mehrere Substanzsignale detektiert, wodurch eine klare Strukturaufklärung nicht möglich war.

Das in 2.1.1.1 isolierte Striatin B wurde für 24 h mit MeOH versetzt und anschließend lyophilisiert. Bei der NMR-Analyse in MeOH- $d_4$  wurde Striatin B nachgewiesen.

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Verschiebungsdaten sowie die zugehörigen NMR-Spektren der jeweiligen Substanzen sind im Anhang 7.1 aufgeführt. Die Strukturen der Striatine A und B sind in der Tabelle 2.2 dargestellt. Die Substanzen Striatine A und B wurden als Standardsubstanzen für die Bestimmung der Kreuzreaktivität im indirekten kompetitiven ELISA verwendet.

Tabelle 2.2: Identifizierte Strukturen der Striatine A und B.

Substanz	Summenformel	Molekulargewicht	Menge
		[g mol $^{-1}$ ]	[mg]
Striatin A	$\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_8$	504,61	1,9
Striatin B	$\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_9$	520,61	1,5



Striatin A:  $\text{R}^1 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2 = \text{COCH}_3$   
 Striatin B:  $\text{R}^1 = \text{OH}$ ,  $\text{R}^2 = \text{COCH}_3$

## 2.2 Sekundärmetabolite aus *Hericium erinaceus*

### 2.2.1 Optimierung der Bildung von Erinacin C

*Hericium erinaceus* wurde in verschiedenen Medien (Tabelle 4.5 bis Tabelle 4.10) kultiviert, um die Konzentration der Zielsubstanz Erinacin C zu optimieren. Das einzige Medium, in dem Erinacin C nachweisbar war, war das ZM1/2-Medium mit Edamin<sup>®</sup> S (Medium 0). Aus diesem Grund wurde dieses Medium als Referenzmedium für die weitere Optimierung verwendet. Alle Werte resultieren aus zwei separat kultivierten Kolben.

#### 2.2.1.1 Weglassversuche

Ziel dieses Versuchs war es, den Einfluss der einzelnen Kohlenstoffquellen auf die Erinacin C-Bildung zu untersuchen. Im Medium 0 (Tabelle 4.10) dienten nicht nur Zucker wie Glucose und Saccharose als Kohlenstoffquellen, sondern auch Melasse, Mannit und Hafermehl. Die in diesem Versuch verwendeten Medien sind in Tabelle 4.11 aufgeführt. Medium 0 wurde als Referenzmedium betrachtet. In den Medien 1 bis 5 wurde die jeweilige Kohlenstoffquelle einzeln weggelassen. In Medium 6 wurde Edamin<sup>®</sup> K anstelle von Edamin<sup>®</sup> S benutzt, um den Unterschied zwischen den beiden Edamin<sup>®</sup>-Qualitäten zu ermitteln. Diese Versuche erfolgten in 250 mL-Erlenmeyerkolben mit 100 mL Nährmedium. Die Kultivierungsdauer betrug jeweils 27 Tage.

In Abbildung 2.7 sind die Erinacin C-Konzentrationen und Biofeuchtmassen für alle verwendeten Medien zusammengefasst. Im Medium ohne Hafermehl wurde kein Erinacin C gebildet, d. h. Hafermehl spielt bei der Biosynthese des Erinacins C eine wichtige Rolle. Allerdings dient das Hafermehl nicht nur als Kohlenstoffquelle, sondern auch als eine wichtige Stickstoffquelle. Eine signifikante Erhöhung der Konzentration an Erinacin C wurde im Medium 6, das mit Edamin<sup>®</sup> K versetzt wurde, erreicht. Die Konzentration betrug  $172,4 \text{ mg L}^{-1}$ , was fast die 8,5-fache Menge im Vergleich zu der im Referenzmedium ( $20,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) gebildeten Menge darstellte. In Medium 6 wurde eine vergleichs-

weise geringe Biofeuchtmasse ( $22,0 \text{ g L}^{-1}$ ) gebildet, allerdings konnte hier eine hohe Erinacin C-Konzentration erzielt werden.

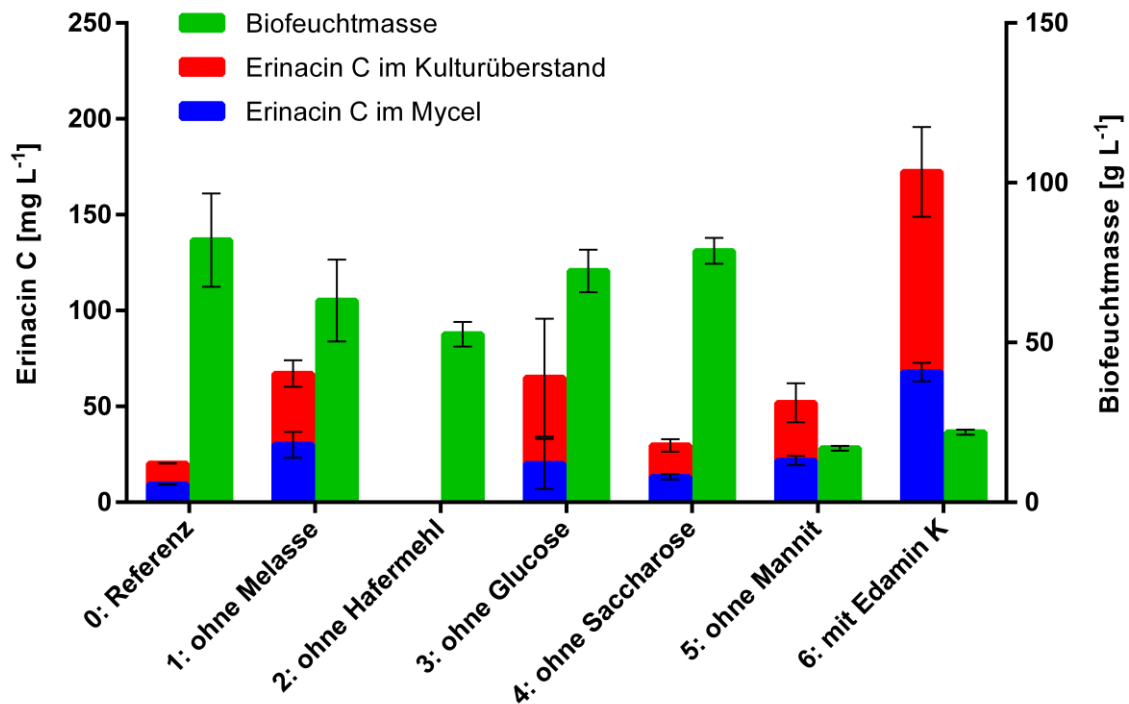


Abbildung 2.7: Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Erinacin C-Konzentration und Biofeuchtmasse bei Kulturabbruch (Tag 27).

### 2.2.1.2 Einfluss des Hafermehls

Basierend auf dem Ergebnis aus 2.2.1.1 wurde in einem weiteren Weglassversuch der Einfluss von Hafermehl im Medium 6 überprüft. Hier wurden die Medien 6 (mit Hafermehl) und 7 (ohne Hafermehl) verwendet (Tabelle 4.11). Die Bildung von Erinacin C wurde von Tag 1 bis Tag 9 mittels HPLC-DAD analysiert (4.8.5, *Produktbildungskinetik*).

Erinacin C wurde trotz Abwesenheit des Hafermehls im Medium 7 gebildet. Allerdings wurde Erinacin C über die gesamte Kulturdauer von neun Tagen im Medium 6 mit Hafermehl in einer höheren Konzentration detektiert (Abbildung 2.8). Ab dem 3. Kulturtag nahm die Bildung von Erinacin C im Medium 6 signifikant zu.

Während die Erinacin C-Konzentration im Medium 7 bereits an Tag 6 ihr Maximum (ca. 85 mg L<sup>-1</sup>) erreichte, stieg sie im Medium 6 weiter an. Bei Kulturabbruch am Tag 9 betrug die Erinacin C-Konzentration 257 mg L<sup>-1</sup>. Dies entsprach im Vergleich zum Medium 7 etwa der 3-fachen Menge. Deshalb wurde Medium 6 als das effektivste Medium zur Produktion von Erinacin C in späteren Versuchen eingesetzt.

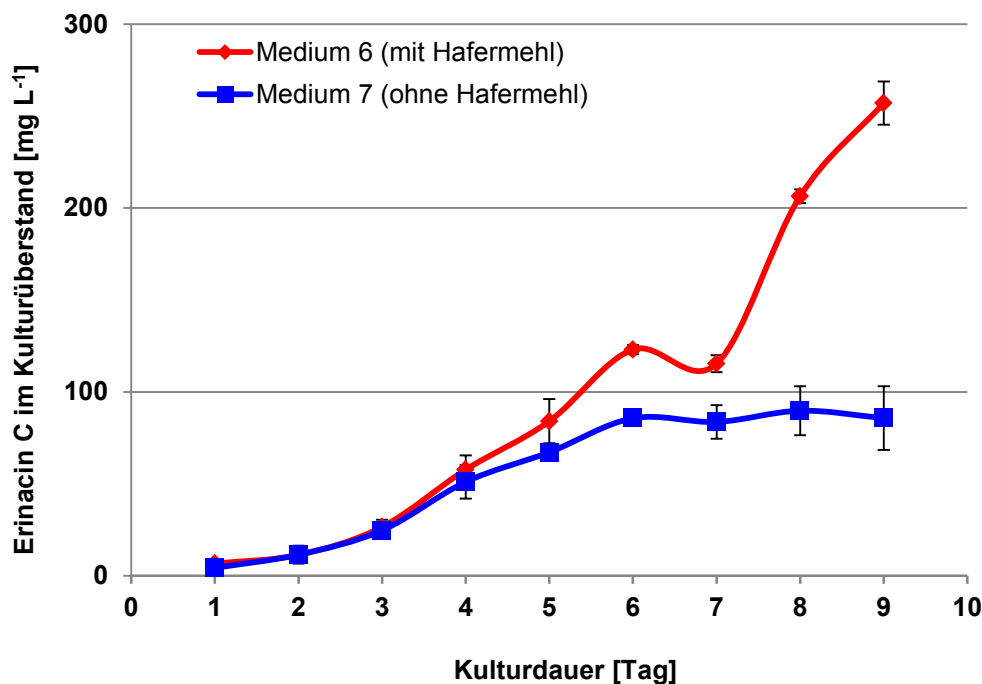


Abbildung 2.8: Erinacin C-Bildung im Medium 6 (mit Hafermehl) und Medium 7 (ohne Hafermehl).

### 2.2.1.3 Einfluss von UV-A-Bestrahlung auf die Kultivierung

Bei *Nidula niveo-tomentosa* konnten Böker *et al.* (2001) und Taupp *et al.* (2008) mit einem Sojapepton-Medium und bei einem 10 Stunden Licht / 14 Stunden Dunkel-Rhythmus eine mehrfache Steigerung der Metabolitkonzentration erreichen. Daher wurde untersucht, ob sich eine Ultraviolett (UV)-Bestrahlung positiv auf die gewünschte Erinacin C-Bildung auswirkt. *H. erinaceus* wurde in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit 40 mL Medium 6 inkubiert. Über den Kulturverlauf

hinweg wurden in definierten Zeitabständen Proben entnommen (jeweils zwei parallel kultivierte Kolben). Die Entwicklung der Biotrockenmasse, des pH-Werts sowie die Summe des gebildeten Erinacins C im Mycel und im Kulturüberstand sind in Abbildung 2.9 bis Abbildung 2.12 dargestellt.

Aus Abbildung 2.9 wird deutlich, dass die UV-A-Bestrahlung das Wachstum von *H. erinaceus* negativ beeinflusste. So betrug die Biotrockenmasse der mit UV-A-Bestrahlung belichteten Kulturen nach 18 Tagen etwa die Hälfte der Kulturen, die im Dunkeln inkubiert wurden.

Der pH-Wert zeigte in den Kulturen mit UV-A-Bestrahlung und unter Lichtausschluss einen gegensätzlichen Verlauf (Abbildung 2.10). In den belichteten Kulturen stieg der pH-Wert langsam an. In den Kulturen, die unter Lichtausschluss geführt wurden, nahm der pH-Wert bis zum Kulturtag 18 stetig ab, um dann wieder anzusteigen.

Bei der Dunkelkultivierung wurde am 12. Kulturtag eine Erinacin C-Konzentration von  $125,6 \text{ mg L}^{-1}$  Medium (entspricht  $29,9 \text{ mg g}^{-1}$  Biotrockenmasse) detektiert (Abbildung 2.11). Danach schwankte die Produktkonzentration um einen Wert von  $120 \text{ mg L}^{-1}$ . An Tag 26 erreichte die Erinacin C-Konzentration einen Wert von ca.  $135 \text{ mg L}^{-1}$  Medium. Das entsprach  $21 \text{ mg g}^{-1}$  Biotrockenmasse, was auf die höhere Biotrockenmasse im Vergleich zum Tag 12 zurückzuführen ist (Abbildung 2.12).

Bei den Kulturen unter UV-A-Bestrahlung wurde die Produktion der Wirkstoffe sehr stark unterdrückt. Mittels HPLC-Analyse wurde kein Erinacin C nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde in späteren Versuchen auf eine UV-A-Bestrahlung der Kulturen verzichtet.

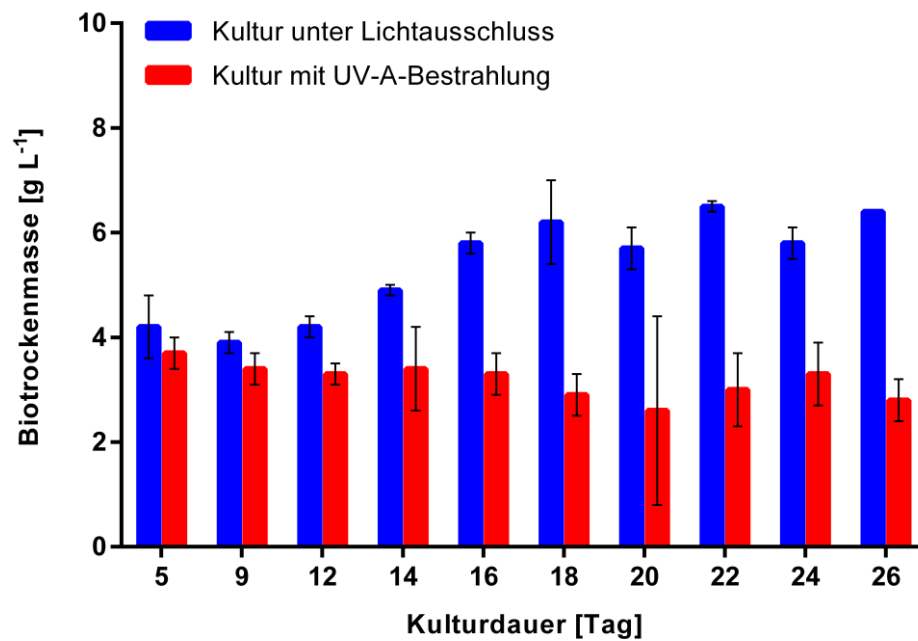


Abbildung 2.9: Biotrockenmassen der Kulturen unter Lichtausschluss und mit UV-A-Bestrahlung.

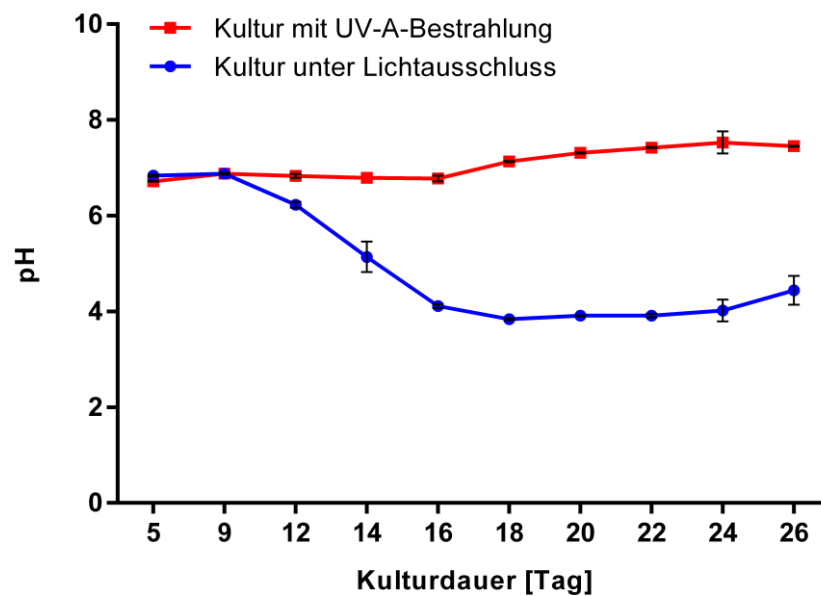


Abbildung 2.10: pH-Verlauf der Kulturen unter Lichtausschluss und mit UV-A-Bestrahlung.



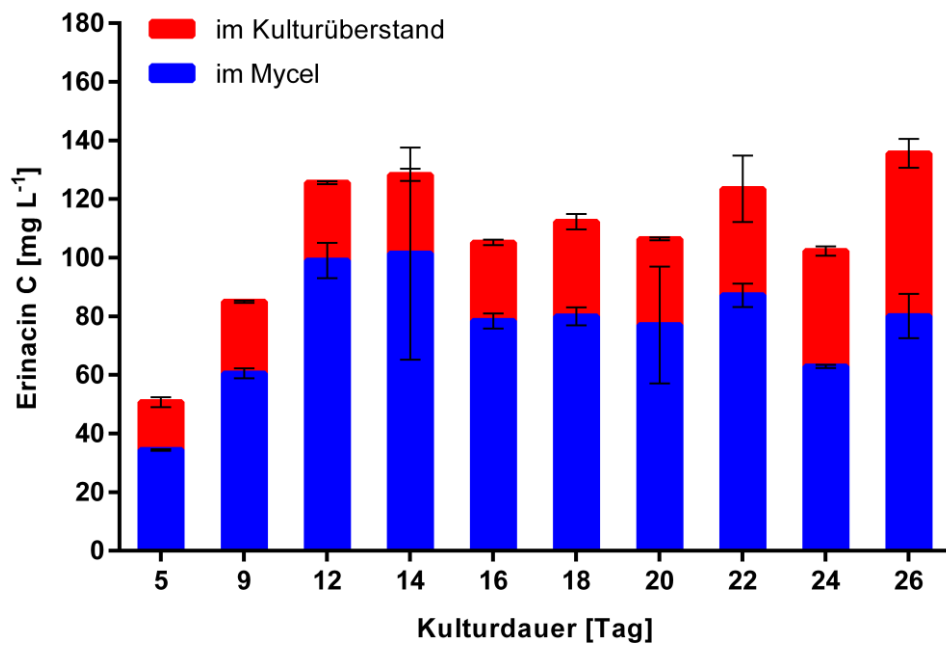


Abbildung 2.11: Erinacin C-Produktion in den Kulturen unter Lichtausschluss.

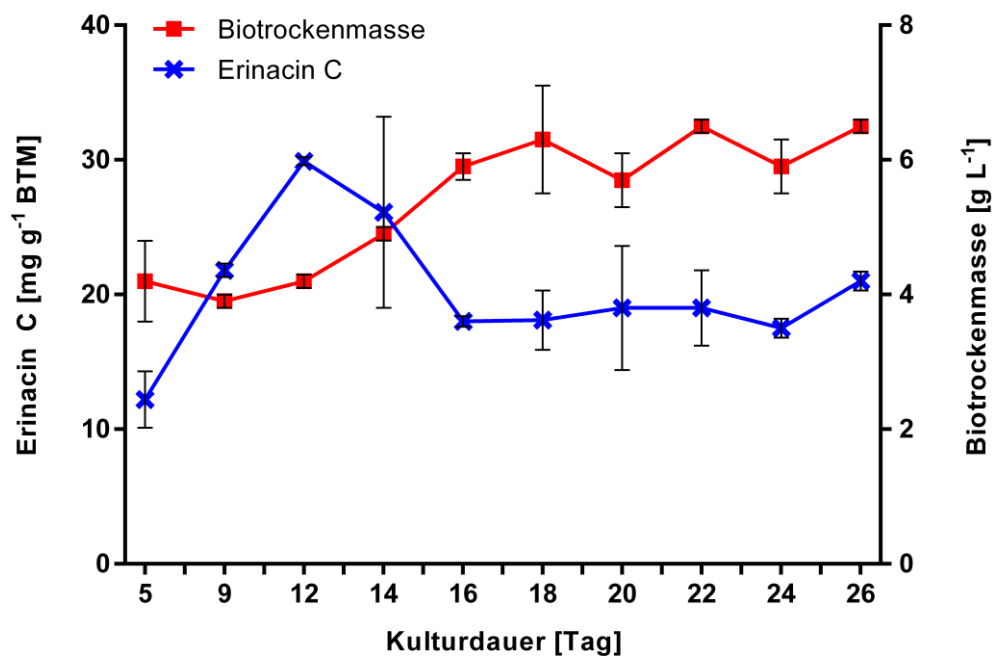


Abbildung 2.12: Zusammenstellung der Erinacin C-Produktion und der Biotrockenmasse in den Kulturen unter Lichtausschluss.

## **2.2.2 Isolierung und Charakterisierung der nicht-flüchtigen Sekundärmetabolite aus *H. erinaceus***

Die Inhaltsstoffe von *H. erinaceus* wurden aus einer Submerskultur sowie aus den Fruchtkörpern extrahiert und mittels präparativer HPLC bzw. HPTLC analysiert und isoliert. Die isolierten Substanzen, die mit einer ausreichenden Reinheit vorlagen, wurden mittels NMR hinsichtlich ihrer Strukturen aufgeklärt. Die Eigenschaften (z. B. Produktbildungskinetik, UV/Vis-Spektren, Bioaktivität) der Sekundärmetabolite wurden mittels HPTLC und HPLC-DAD charakterisiert.

### **2.2.2.1 Identifizierte Sekundärmetabolite aus der Submerskultur**

#### Im Medium 6 gebildete Sekundärmetabolite:

Aus 2,2 L Submerskultur von *H. erinaceus* im Medium 6 (Kulturtag 18) wurden 66,9 g Biofeuchtmasse gewonnen, die nach 4.7.4 und 4.6.1 aufgearbeitet und deren Rohextrakt (583 mg) nach 4.8.2.2 aufgetrennt wurde.

Aus dem Rohextrakt konnten 47,8 mg Erinacin C ( $C_{25}H_{38}O_6$ ) mit einer Reinheit von > 95% isoliert werden (Tabelle 2.3). Dieses wurde für die biologische Charakterisierung (durchgeführt von IMD) verwendet und als Standard für weitere Fermentationsexperimente und für die *Fast Centrifugal Partition Chromatography* (FCPC) an der TU Dortmund bereitgestellt.

Des Weiteren konnten aus dem Rohextrakt 3,4 mg Erinacin F ( $C_{25}H_{36}O_6$ ) mit einer Reinheit von > 95% isoliert werden.

Darüber hinaus gelang es, den neuen, noch nicht in der Literatur beschriebenen Naturstoff 4-Chlor-3,5-dimethoxybenzoesäure ( $C_9H_9ClO_4$ ) zu isolieren (5,6 mg), welcher nicht zu den Striaten oder Erinacinen gehört (Abbildung 2.13). Diese Verbindung besitzt ein Molekulargewicht von  $216,62 \text{ g mol}^{-1}$ .

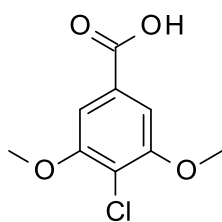


Abbildung 2.13: 4-Chlor-3,5-dimethoxybenzoesäure ( $C_9H_9ClO_4$ ).

Eine weitere Substanz (56,0 mg) mit der Summenformel  $C_{18}H_{21}NO_5$  konnte aus der Submerskultur mit hoher Reinheit isoliert und identifiziert werden (Abbildung 2.14). Sie hat ein Molekulargewicht von  $331,36 \text{ g mol}^{-1}$ .

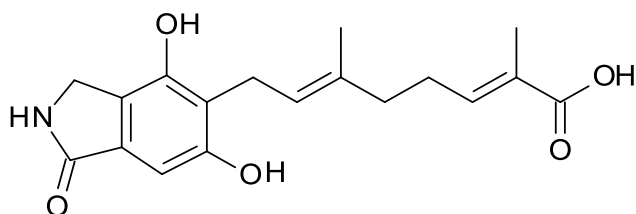
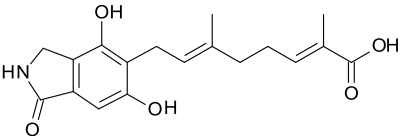
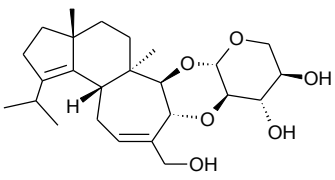
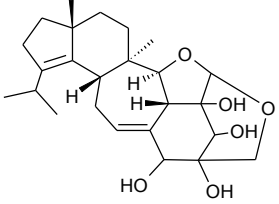
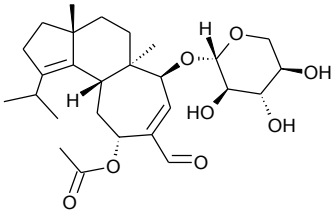
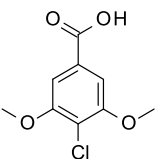


Abbildung 2.14: Struktur des isolierten Naturstoffs mit der Summenformel  $C_{18}H_{21}NO_5$ .

Aus 1 L Submerskultur von *H. erinaceus* im Medium 6 (Kulturtag 4) wurden 253,0 mg Rohextrakt aus 28,3 g Biofeuchtmasse gewonnen. Erinacin P konnte mittels präparativer HPLC isoliert werden (ca. 1 mg Erinacin P aus 30 mg Rohextrakt). Die Struktur wurde mittels NMR (in Kooperation mit dem Institut für organische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen) aufgeklärt. Die Verschiebungsdaten aus den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Messungen sind im Anhang 7.1 dargestellt.

Zusammenfassend wurden folgende Substanzen aus Submerskulturen von *H. erinaceus* im Medium 6 identifiziert (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Identifizierte Substanzen aus Submerskulturen von *H. erinaceus* im Medium 6.

Struktur	Molekulargewicht [g mol <sup>-1</sup> ]	Summenformel	<i>m/z</i> ESI +	<i>m/z</i> ESI -
	331,36	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>5</sub>	<sup>a</sup> 332,26 <sup>b</sup> 663,58	<sup>c</sup> 330,27
	434,56	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub> (Erinacin C)	<sup>b</sup> 869,65	<sup>d</sup> 479,44
	432,55	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub> (Erinacin F)	<sup>b</sup> 865,85	<sup>c</sup> 431,42 <sup>d</sup> 477,43
	492,27	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> O <sub>8</sub> (Erinacin P)	<sup>e</sup> 515,26	-
	216,62	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> ClO <sub>4</sub> (4-Chlor-3,5-dimethoxybenzoesäure)	-	<sup>c</sup> 215,04

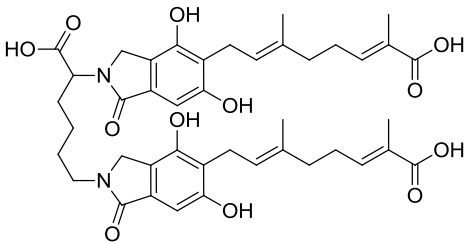
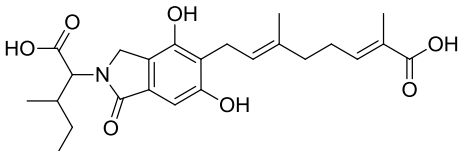
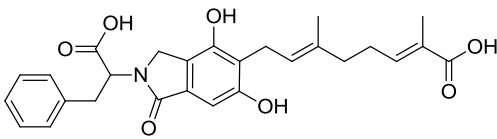
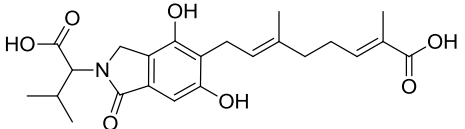
a: [M+H]<sup>+</sup>; b: [2M+H]<sup>+</sup>; c: [M-H]<sup>-</sup>; d: [M+Formiat-H]<sup>-</sup>; e: [M+Na]<sup>+</sup>

Im YM6,3-Medium gebildete Sekundärmetabolite:

Aus 1,6 L Submerskultur von *H. erinaceus* im YM6,3-Medium (Kulturtag 7) wurden 28,4 g Biofeuchtmasse gewonnen, die ohne vorherigen Zellaufschluss über Nacht mit Aceton extrahiert wurden. Des Weiteren wurde wie in 4.6.1 beschrieben verfahren. Insgesamt wurden 339,3 mg Rohextrakt aus der Biomasse und 471,2 mg Rohextrakt aus dem Kulturüberstand gewonnen. Daraus wurden folgende Substanzen isoliert und identifiziert (Tabelle 2.4).

Alle vier Verbindungen gehören zur Substanzklasse der Meroterpenoide und weisen eine Isoindoleinheit auf. Die Substanzen sind in der *Datenbank Dictionary of Natural Products* (DNP, Version 18:1 und 19:1) und aus anderen Literaturquellen bisher nicht bekannt. In diesen beiden Rohextrakten konnten mittels LC-MS keine Erinacine nachgewiesen werden.

Tabelle 2.4: Identifizierte Substanzen aus *H. erinaceus* in YM6,3-Medium.

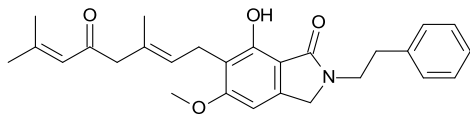
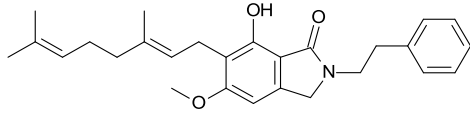
Struktur	Molekular- gewicht [g mol <sup>-1</sup> ]	Summenformel	<i>m/z</i> ESI +	<i>m/z</i> ESI -
	774,85	C <sub>42</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>	<sup>a</sup> 775,71	<sup>c</sup> 773,71
	445,51	C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>7</sub>	<sup>a</sup> 446,41 <sup>b</sup> 891,94	<sup>c</sup> 444,41
	479,52	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>7</sub>	<sup>a</sup> 480,44	<sup>c</sup> 478,43
	431,48	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>7</sub>	<sup>a</sup> 432,58 <sup>b</sup> 863,83	<sup>c</sup> 430,37 <sup>d</sup> 861,85

a: [M+H]<sup>+</sup>; b: [2M+H]<sup>+</sup>; c: [M-H]<sup>-</sup>; d: [2M-H]<sup>-</sup>

### 2.2.2.2 Identifizierte Sekundärmetabolite aus Fruchtkörpern von *H. erinaceus*

Die Fruchtkörper wurden wie in 4.6.1 beschrieben aufgearbeitet. Aus 162,44 g Fruchtkörpern, die mit Aceton und Ethylacetat extrahiert wurden, wurden insgesamt 1,12 g (entsprechend 0,69% w/w der Fruchtkörper) Rohextrakt gewonnen. Leider waren alle Fraktionen aus der präparativen HPLC entweder nicht rein genug oder wiesen zu wenig Substanz auf, um damit eine NMR-Analyse durchzuführen. Aus einem zweiten Ansatz (156,84 g Fruchtkörper), der mit Aceton und Dichlormethan extrahiert wurde, wurden 0,93 g (entsprechend ca. 0,59% w/w der Fruchtkörper) Rohextrakt gewonnen. In diesem Rohextrakt wurden 2,8 mg Hericenon B und 19,8 mg Hericerin identifiziert (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Isolierte Substanzen aus Fruchtkörpern von *H. erinaceus*.

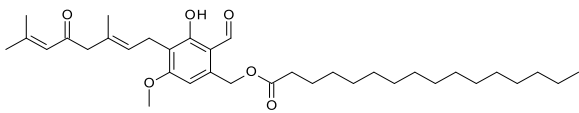
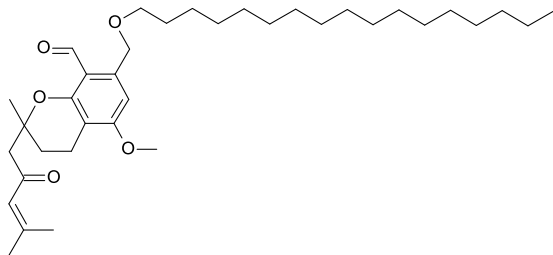
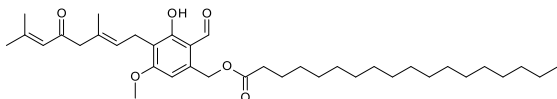
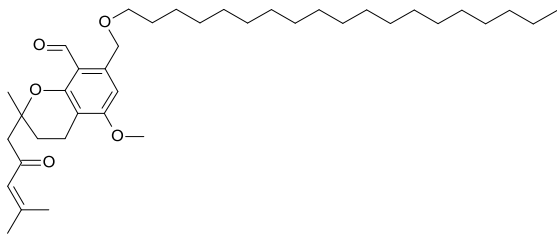
Struktur	Molekular- gewicht [g mol <sup>-1</sup> ]	Summenformel	<i>m/z</i> ESI +	<i>m/z</i> ESI -
	433,54	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub> (Hericenon B)	<sup>a</sup> 434,62 <sup>b</sup> 867,84	<sup>c</sup> 432,39 <sup>d</sup> 865,87
	419,56	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>3</sub> (Hericerin)	<sup>a</sup> 420,42	<sup>c</sup> 418,40

a: [M+H]<sup>+</sup>; b: [2M+H]<sup>+</sup>; c: [M-H]<sup>-</sup>; d: [2M-H]<sup>-</sup>

Für die Fraktionen, die auf Grund nicht ausreichender Reinheit bzw. geringer Mengen nicht mittels NMR analysiert werden konnten, wurden anhand der MS-Daten und der Datenbank DNP folgende Strukturen vorgeschlagen (Tabelle 2.6).

Mit einem *m/z*-Verhältnis von 571,69 im ESI-positiv-Modus sowie einem *m/z*-Verhältnis von 569,67 im ESI-negativ-Modus waren die Isomeren Hericenon C und F massenspektrometrisch nicht zu unterscheiden. Ebenso weisen Hericenon D und G die gleiche Summenformel mit einem Molekulargewicht von 598,9 g mol<sup>-1</sup> auf. Die Moleküle wurden bei *m/z* 599,71 im ESI-positiv-Modus und *m/z* 597,70 im ESI-negativ-Modus detektiert.

Tabelle 2.6: Substanzen aus den Fruchtkörpern von *H. erinaceus* mit Strukturvorschlag.

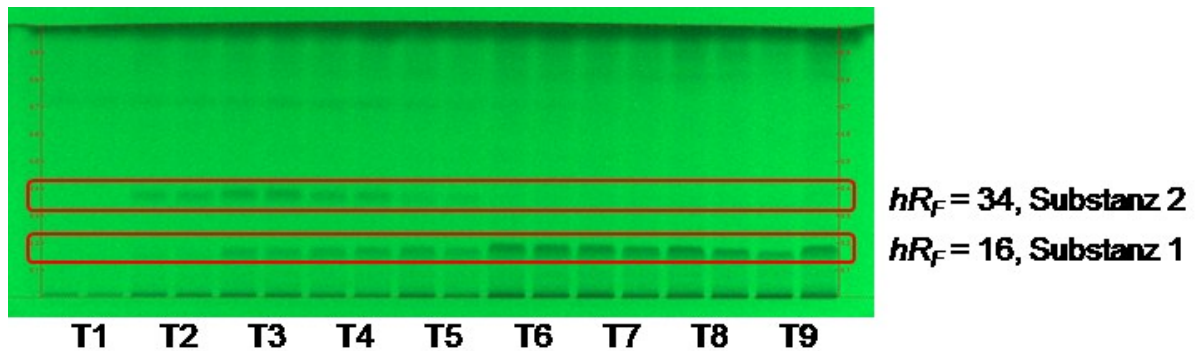
Struktur	Molekulargewicht [Da]	Summenformel
	570,80	C <sub>35</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub> (Hericenon C)
	570,84	C <sub>35</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub> (Hericenon F)
	598,85	C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub> (Hericenon D)
	598,90	C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub> (Hericenon G)

### 2.2.2.3 Produktbildungskinetik

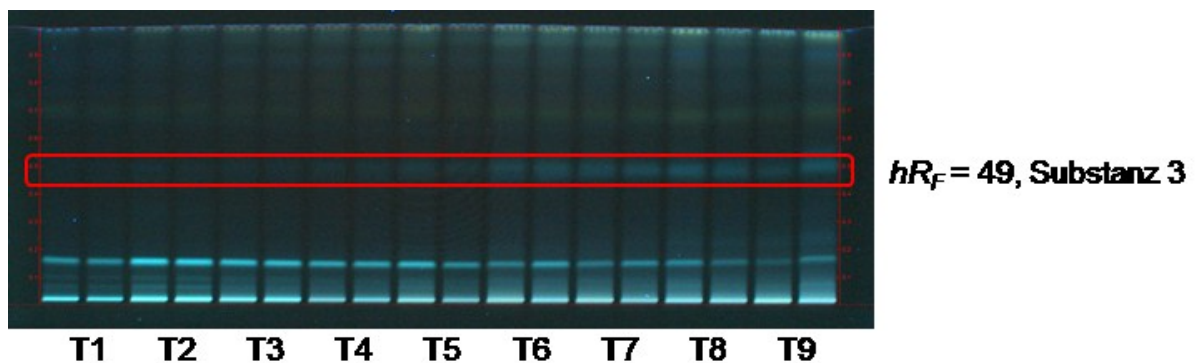
In den Kulturen von *H. erinaceus* in Medium 6 (400 mL Kulturmedium + 40 mL Innokulum in 1 L Erlenmeyerkolben) wurde die Produktbildungskinetik von Tag 1 bis Tag 9 mittels HPTLC (4.8.5) sowie HPLC-DAD (4.8.1.2) analysiert.

Die Konzentrationen der Substanzen mit einem Retentionsfaktor ( $hR_F$ ) von 16 (Substanz 1), 34 (Substanz 2), und 49 (Substanz 3) wiesen eine deutliche Zeitabhängigkeit auf (Abbildung 2.15). Die Konzentrationen der Substanzen 1 und 3 stiegen während der Kultivierung stetig an. Die Konzentration der Substanz 2 erreichte ihr Maximum am dritten Kulturtag.





(a)



(b)

Abbildung 2.15: Untersuchung der Produktbildungskinetik mittels HPTLC. Rohextrakte der Kulturüberstände im Medium 6 von Tag 1 bis Tag 9 (T1 - T9). Dokumentation des Chromatogramms bei 254 nm (a) und 366 nm (b).

Mittels HPLC-DAD wurde festgestellt, dass Erinacin P in den ersten drei Tagen gebildet und danach schnell abgebaut wurde. Mit dem Abbau einhergehend war ein Anstieg der Konzentration von Erinacin C zu beobachten (Abbildung 2.16). Substanz 2 mit  $hR_F = 34$  in der HPTLC könnte demnach Erinacin P entsprechen (Abbildung 2.17). Substanz 2 wurde als Zielsubstanz weiter untersucht, da sie eventuell eine Vorstufe von Erinacin C darstellt.

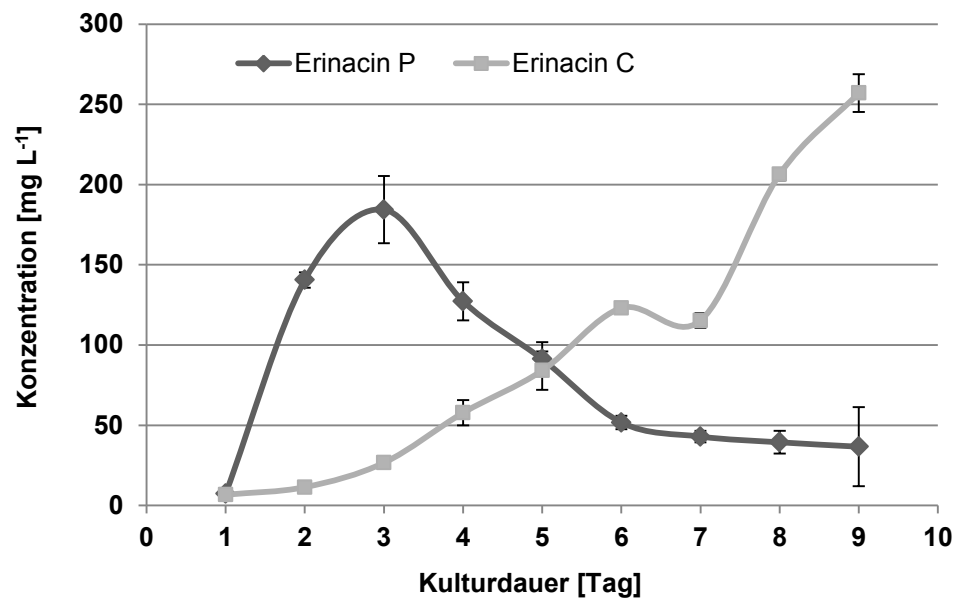


Abbildung 2.16: Produktbildungskinetik der Erinacine P und C im Kulturüberstand im Medium 6 über neun Kulturtage mittels HPLC-DAD bei 210 nm.

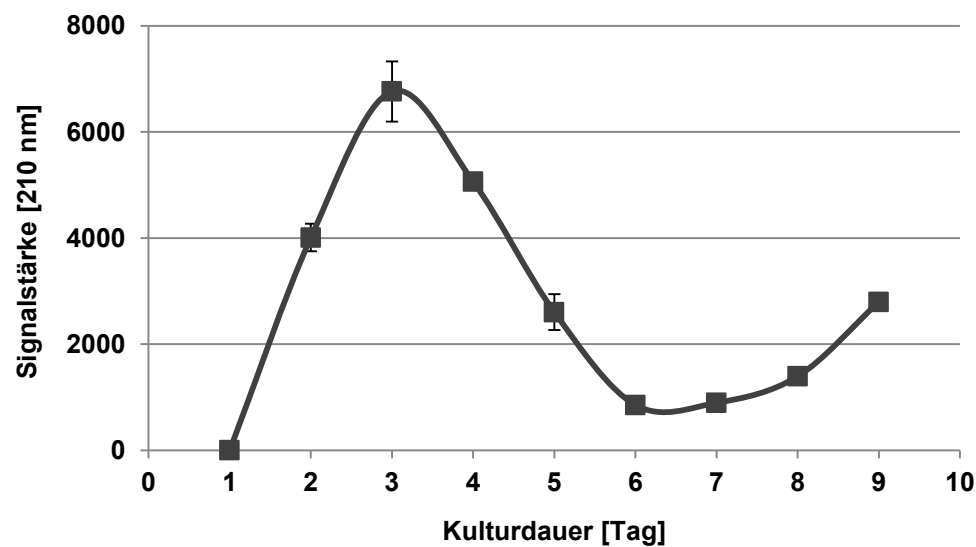


Abbildung 2.17: Bildung und Abbau von Substanz 2 ( $hR_F = 34$ ) im Kulturüberstand im Medium 6 (HPTLC).

#### 2.2.2.4 UV/Vis-Spektren

Das HPTLC-UV/Vis-Spektrum der Substanz 2 wurde aufgenommen und mit dem HPLC-DAD-Spektrum von Erinacin P verglichen (Abbildung 2.18). Dabei wies Substanz 2 ein sehr ähnliches Spektrum mit einem Absorptionsmaximum von 233 nm auf.

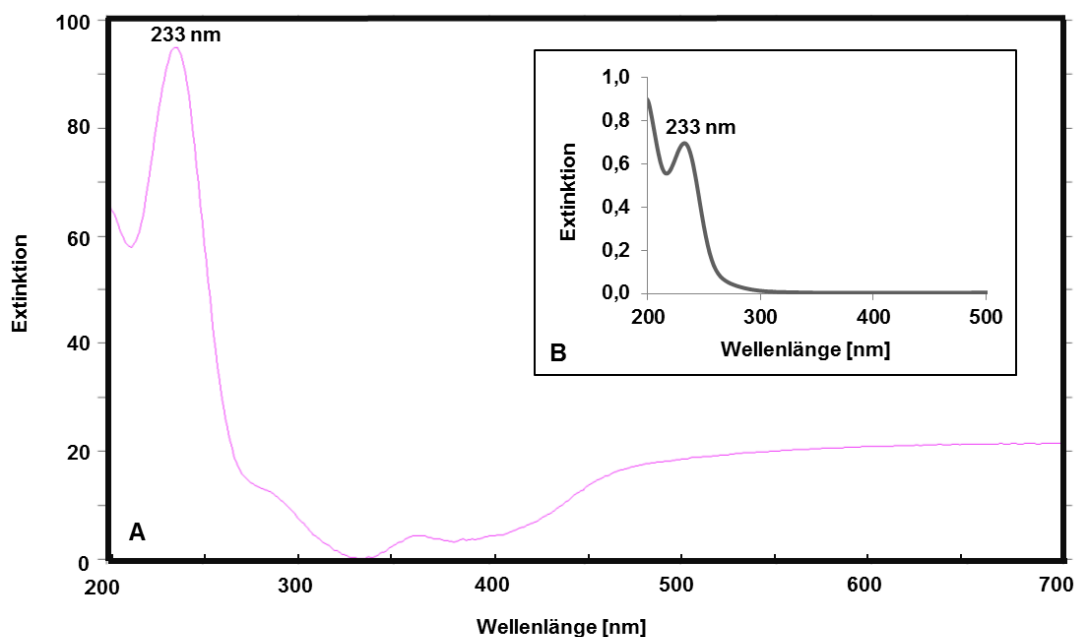


Abbildung 2.18: UV/Vis-Spektren. A: Substanz 2, HPTLC. B: Erinacin P, HPLC-DAD.

#### 2.2.2.5 Bioaktivität

Zur Untersuchung der Bioaktivität der Metabolite aus *H. erinaceus* wurde das biolumineszierende gramnegative Bakterium *Vibrio fischeri* eingesetzt (4.8.5). Die Substanzen mit hemmender bzw. toxischer Wirkung gegen das Bakterium erscheinen als dunkle Zonen auf dem lumineszierenden Plattenhintergrund. Alle 3 min wurde über einen Zeitraum von 30 min ein Foto von der Platte aufgenommen. Damit konnte die Zeitabhängigkeit der Bioaktivität bestimmt

werden. Ein Überblick über die bioaktiven Substanzen aus *H. erinaceus* ist Abbildung 2.19 zu entnehmen.

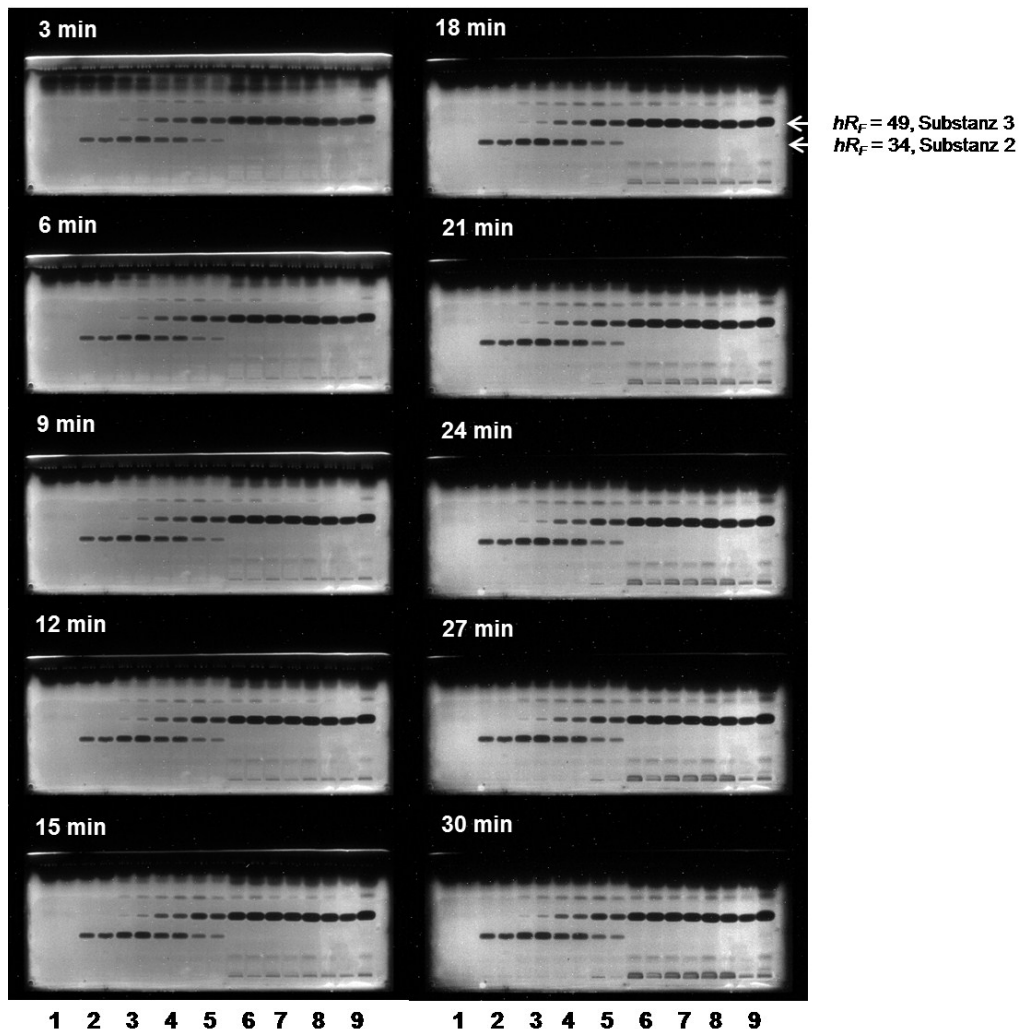


Abbildung 2.19: Bioaktivität der Sekundärmetabolite gegenüber *Vibrio fischeri* in 3-minütigen Aufnahmeintervallen. Tag 1 bis Tag 9 (1 bis 9), jeweils Doppelbestimmung.

Die dunklen Zonen zeigen eine deutliche Bioaktivität gegen *V. fischeri*. Einige Zonen (z. B. unterer Plattenbereich von Tag 6 bis Tag 9) wurden mit längerer Inkubationszeit dunkler. Die Substanzen 2 und 3 ( $hR_F$  34 und 49) sind von besonderem Interesse (Abbildung 2.20 und Abbildung 2.21), da diese nicht nur eine zeitabhängige Biosynthese zeigen (Abbildung 2.15), sondern auch bioaktiv

sind. Allerdings konnte kein vergleichbarer Peak für Substanz 3 (blau fluoreszierend) mittels HPLC-UV-Detektion identifiziert werden.

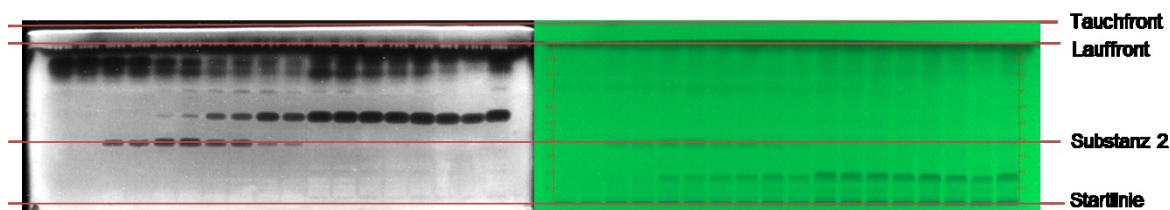


Abbildung 2.20: HPTLC-Bioaktivitätsdetektion von Substanz 2 nach Inkubation mit *Vibrio fischeri* (links) und dokumentiert bei 254 nm (rechts).

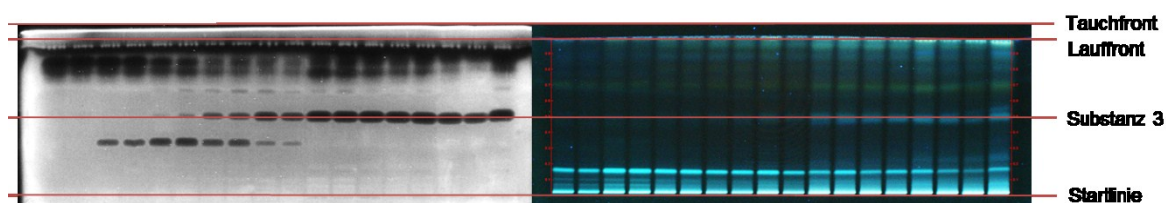


Abbildung 2.21: HPTLC-Bioaktivitätsdetektion von Substanz 3 nach Inkubation mit *Vibrio fischeri* (links) und dokumentiert bei 366 nm (rechts).

#### 2.2.2.6 Derivatisierung

Um das Ermitteln einer Summenformel zu erleichtern, wurden die entwickelten Dünnschichtplatten mit verschiedenen Reagenzien derivatisiert (4.8.5). Die Visualisierung der derivatisierten Dünnschichtplatten sowie eines Blindwertes sind in Abbildung 2.22 dargestellt.

Substanz 3 wies keine mit DPPH-Radikal-Reagenz detektierbaren antioxidativen Eigenschaften auf, könnte jedoch ein Glykosid sein (Gelbfärbung mit Diphenylamin-Anillin-Reagenz (DPA)). Substanz 3 reagierte nicht mit Primulin-Reagenz, welches lipophilere Verbindungen wie Phosphoglycerolipide oder Glyceroglycolipide indiziert. Aufgrund der leicht blauen Fluoreszenz beim Reagenz nach Neu könnte eine flavonoide Struktur vorliegen. Mit dem Ninhydrin-Reagenz konnten keine primären Aminogruppen oder eine peptidartige Struktur nachgewiesen werden.

Substanz 2 zeigte lediglich beim Zuckernachweis eine gelbliche Färbung, d.h. hier handelt es sich nicht um Glucose oder Saccharose. Weiter konnte gezeigt werden, dass Substanz 2 keine primären Aminogruppen enthält oder eine peptidartige Struktur aufweist.

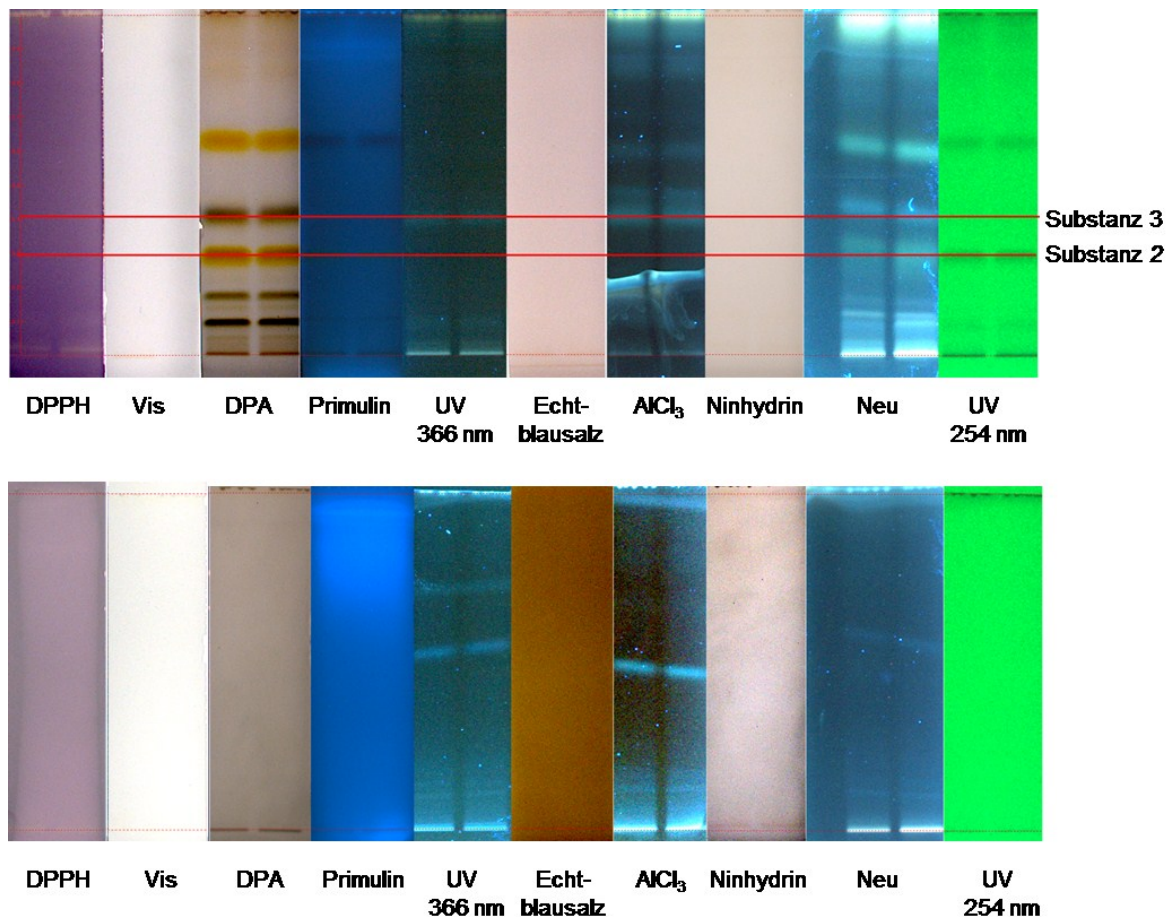


Abbildung 2.22: HPTLC-Chromatogramme nach verschiedenen post-chromatographischen Derivatisierungen. Oben: Extrakt der Submerskultur (Tag 4). Rote Linie markiert Substanzen 2 und 3. Unten: Kontroll-Chromatogramme des Extrakts des Kulturmediums ohne Pilz. Extrakte vor den Derivatisierungen dokumentiert bei 254 nm, 366 nm und Weißlicht (Vis).

### 2.2.2.7 HPTLC-MS/HPTLC-NMR

Das mittels präparativer HPLC isolierte Erinacin P sowie der Rohextrakt aus der Submerskultur (Kulturtag 4) von *H. erinaceus* wurden mittels HPTLC-MS analysiert. Die durch HPTLC-MS ermittelten Molekülionen  $m/z$  im ESI<sup>+</sup>-Modus der Standardsubstanz Erinacin P waren  $m/z$  515,2 [M+Na]<sup>+</sup> und  $m/z$  455,1 [M+Na-CH<sub>3</sub>COOH]<sup>+</sup>. Für Substanz 2 wurden die gleichen Massen detektiert (Abbildung 2.23).

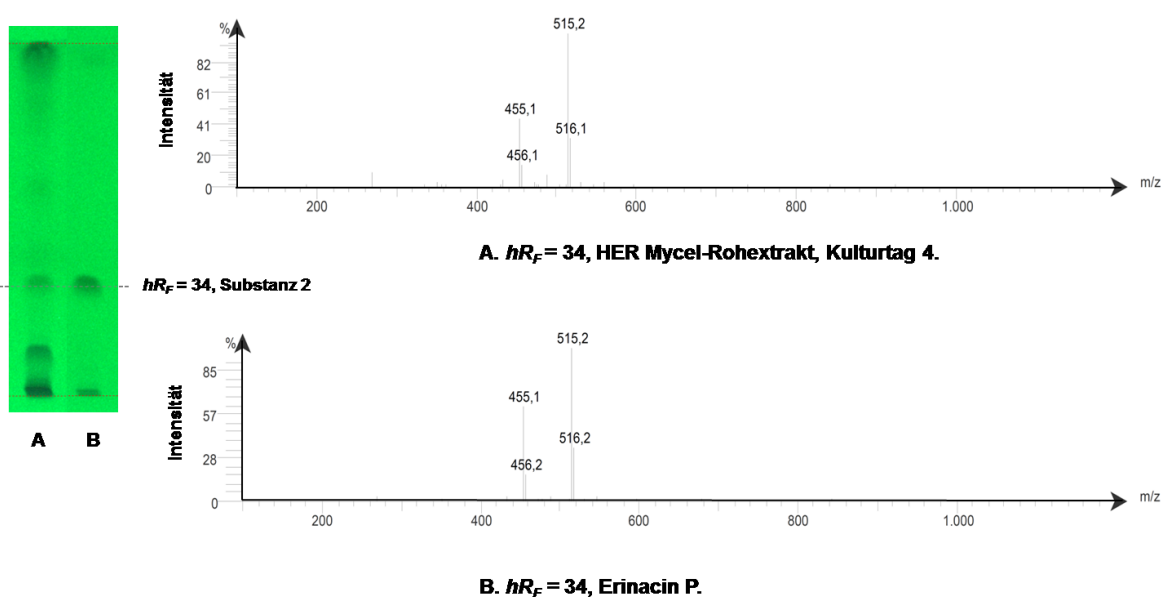


Abbildung 2.23: MS-Spektren (ESI<sup>+</sup>) der Substanz mit  $hR_F = 34$  aus HPTLC-Platte.  
 A: *H. erinaceus* (HER) Mycel-Rohextrakt an Kulturtag 4.  
 B: Referenzsubstanz Erinacin P.  $m/z$  515,2 für [M+Na]<sup>+</sup> und 455,1 für [M+Na-CH<sub>3</sub>COOH]<sup>+</sup>.

Mit Hilfe des TLC-MS-Interfaces wurde die Substanz 2 aus der HPTLC-Platte isoliert. Eine anschließende Analyse mittels NMR stellte sich als schwierig heraus. Eine Strukturabsicherung von Substanz 2 sowie vom Erinacin P-Standard aus der HPTLC-Platte war wegen zu geringer Substanzmenge nicht möglich.

### 2.2.3 Untersuchung flüchtiger Inhaltsstoffe aus Submerskultur von *H. erinaceus*

In Submerskulturen von *H. erinaceus* im Medium 6 wurde mittels GC-MS eine halogenierte Substanz detektiert. Für den Peak mit einem Kováts-Index (KI)-Wert von 1641 wurde von der Datenbank die Struktur 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd ( $C_9H_9ClO_3$ ) vorgeschlagen (Abbildung 2.24). Das Massenspektrum der Standardsubstanz 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd (KI = 1620) wies allerdings leichte Unterschiede zum Massenspektrum der Probe auf (Abbildung 2.25). Da 4-Chlor-3,5-dimethoxybenzoesäure als ein Metabolit in der Submerskultur von *H. erinaceus* mittels NMR identifiziert wurde (Abbildung 2.13), könnte es sich in der Probe um das Isomer 4-Chlor-3,5-dimethoxybenzaldehyd handeln (Abbildung 2.26).

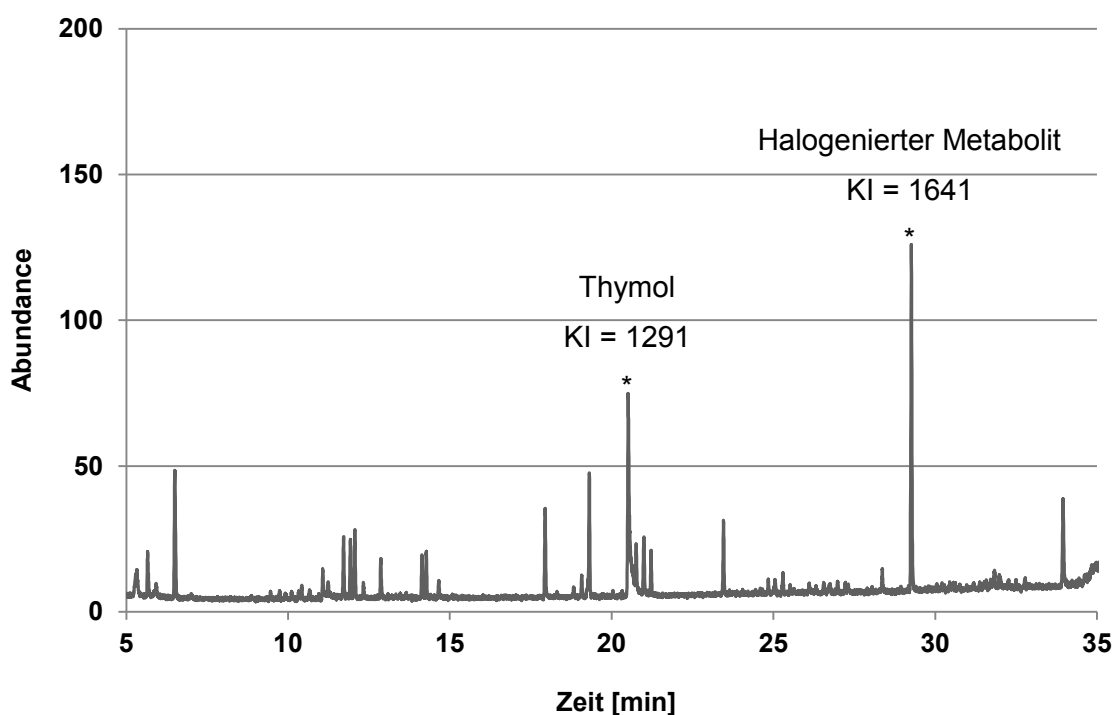


Abbildung 2.24: Gaschromatogramm des Extrakts einer Submerskultur von *H. erinaceus* in SNL-Medium (DB-5-Säule).



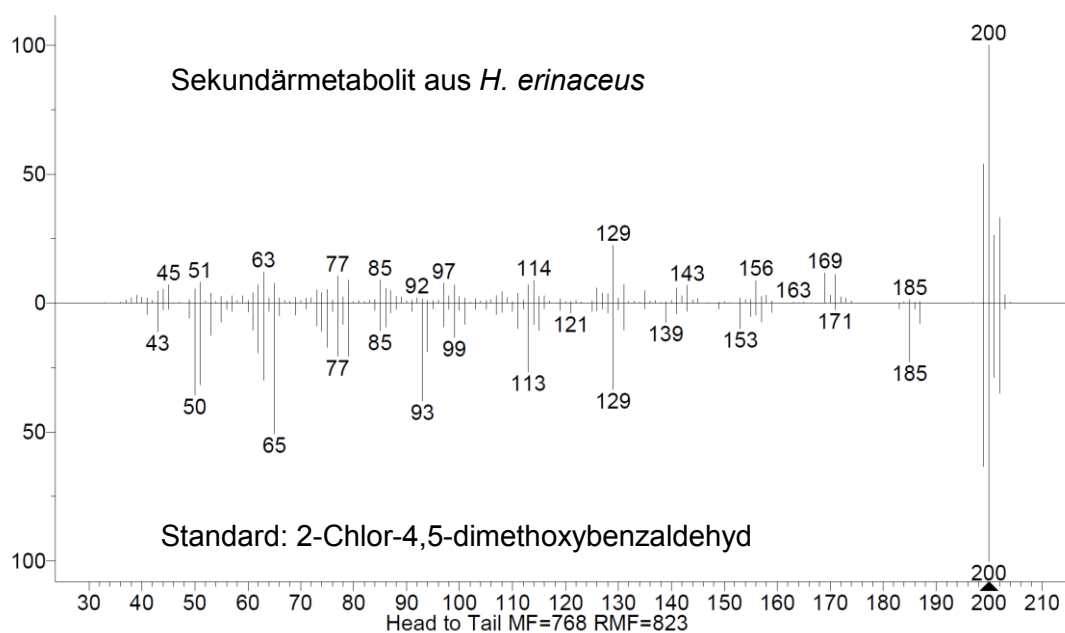


Abbildung 2.25: Massenspektren der halogenierten Substanz mit KI = 1641 aus der Submerskultur von *H. erinaceus* (oben) und des Standards 2-Chlor-4,5-dimethoxybenzaldehyd mit KI = 1620 (unten).

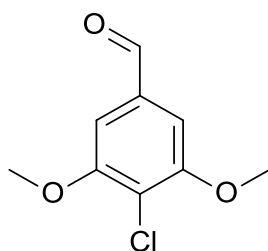


Abbildung 2.26: Strukturvorschlag für den halogenierten Sekundärmetaboliten aus der Submerskultur von *H. erinaceus*: 4-Chlor-3,5-dimethoxybenzaldehyd.

## 2.3 Lokalisierung der Sekundärmetabolite

Um einen Anhaltspunkt für den industriellen Downstreaming Prozess geben zu können, wurde die Lokalisierung der Sekundärmetabolite in der Basidiomycetenkultur am Beispiel von *C. striatus* und *H. erinaceus* mittels MALDI (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)-MS-Imaging und verschiedener Zellaufschlussmethoden untersucht.

### 2.3.1 MALDI-MS-Imaging zur Lokalisierung der Sekundärmetabolite

MALDI (Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation)-MS-Imaging ist eine bildgebende massenspektrometrische Technik zur Analyse strukturierter biologischer und technischer Oberflächen wie Zelloberflächen und Gewebeproben. Die Informationen zur detektierten Substanz werden dabei als zweidimensionale Verteilungsbilder dargestellt. Diese Technik wurde angewendet, um die Lokalisierung der von den Basidiomyceten *C. striatus* und *H. erinaceus* gebildeten Sekundärmetabolite zu ermitteln. Alle dargestellten Verteilungsbilder haben ein Massenfenster von  $\Delta m/z = 0,01$  und eine Massengenauigkeit  $< 2$  ppm.

#### 2.3.1.1 Striatale in Submerskulturen aus *C. striatus*

Zunächst wurden die Standardsubstanzen Striatal A und B analysiert, um die entsprechenden  $m/z$ -Verhältnisse zu bestimmen. Die Standardsubstanzen von Striatal A und B zeigten folgende Molekülionen bei der MALDI-MS (Tabelle 2.7). Diese Zielmassen wurden später in biologischem Material (z. B. Ausschnitt eines Pellets aus Submerskultur) gezielt detektiert, um ihre Verteilungsbilder darzustellen.

Tabelle 2.7:  $m/z$ -Verhältnisse der Standards Striatal A und B bei der Analyse mittels MALDI-MS.

Standard	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+K]^+$
Striatal A	473,25338	495,23532	511,20926
Striatal B	489,24829	511,23024	527,20417

Abbildung 2.27 zeigt ein für die MALDI-MS-Messung verwendetes Pellet von *C. striatus*. Die Verteilung der Striatale A und B im Pellet ist in der Abbildung 2.28 dargestellt. Die Produkte Striatal A und B sind innerhalb des Pellets lokalisiert und fast homogen verteilt. Die Striatale C und D konnten ebenfalls detektiert werden ( $m/z$ -Verhältnisse basierend auf den theoretisch berechneten Werten, Tabelle 4.26); diese verteilen sich ebenfalls nahezu homogen innerhalb des Pellets. Da die Massengenauigkeit kleiner als 2 ppm beträgt, konnte das MALDI-MS-Imaging auch als eine Nachweismethode für die Substanzen, für die keine Standards vorhanden waren, angewendet werden.

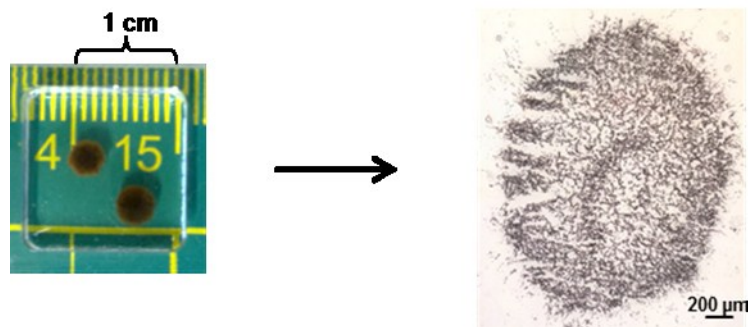


Abbildung 2.27: Links: Pellets von *C. striatus* aus einer Submerskultur; rechts: Mikroskopische Aufnahme eines Pelletausschnittes.

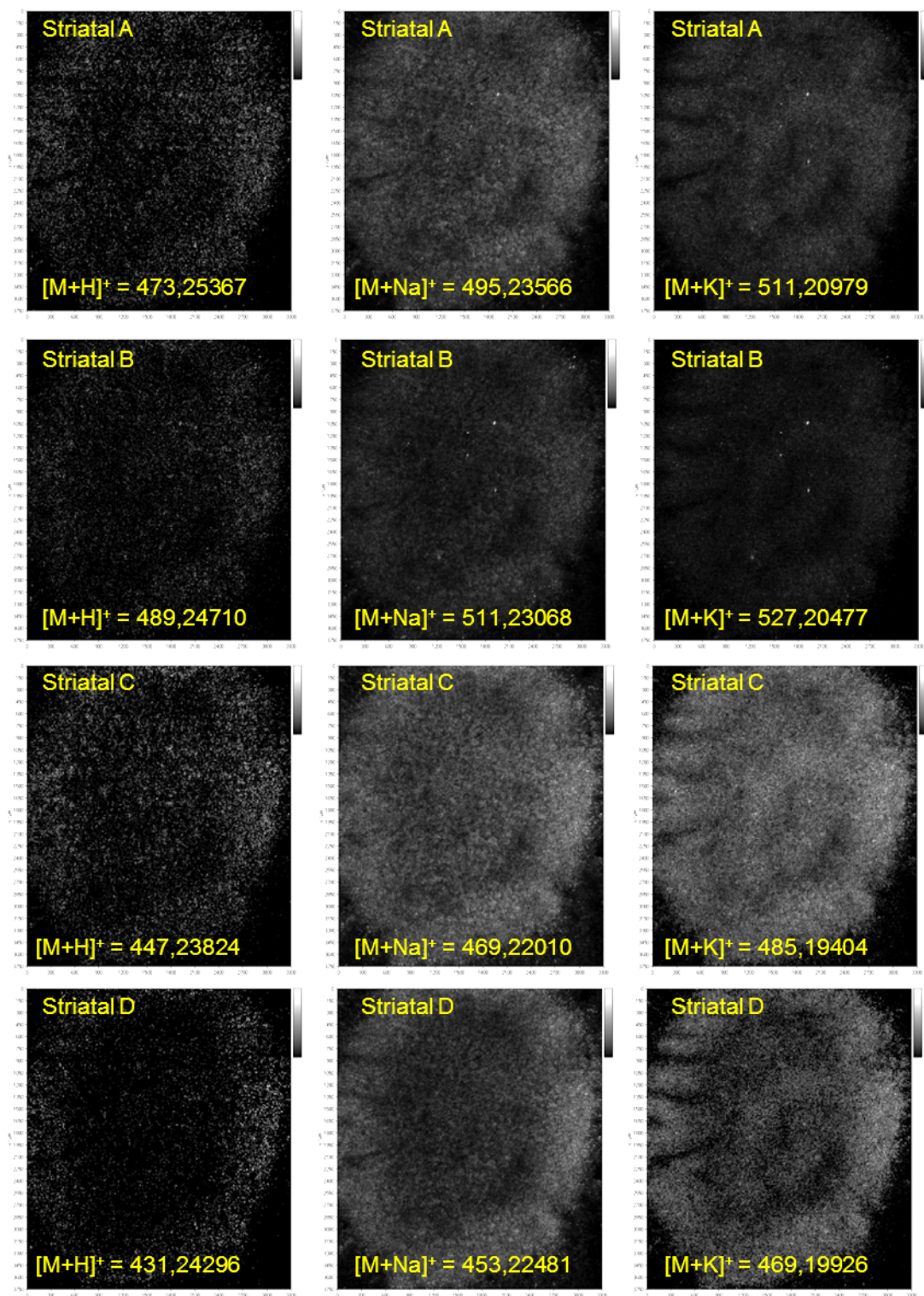


Abbildung 2.28: Verteilungsbilder der Striatale A, B, C und D in einem Pellet aus Submerskultur von *C. striatus* dargestellt mittels MALDI-MS-Imaging. Links  $[M+H]^+$ , Mitte  $[M+Na]^+$  und rechts  $[M+K]^+$ . Alle Angaben weisen eine Massengenauigkeit < 2 ppm und eine Pixelauflösung von 15  $\mu\text{m}$  auf.

### 2.3.1.2 Sekundärmetabolite aus Submerskulturen von *H. erinaceus*

Eine mikroskopische Aufnahme eines Pelletausschnittes von *H. erinaceus* ist in Abbildung 2.29 dargestellt; Abbildung 2.30 zeigt die Verteilungsmuster verschiedener Erinacine darin. Mittels MALDI-Imaging wurden die Erinacine A, B, E und F im Pellet detektiert. Da sie die gleiche Masse (gleiche Summenformel) aufwiesen, konnten hier nicht weiter differenziert werden. Erinacin I, J und P waren nur in Spuren nachweisbar. Erinacin D, K, Q und R waren im Pellet nicht nachweisbar. Erinacin C lag von allen Erinacinen in den höchsten Konzentrationen im Pellet vor. In der Mitte des Pellets war die Signalintensität höher als am Rand. Erinacine I und J zeigten außerdem ein anderes Verteilungsmuster als die Erinacine A, B, C, E, F und P.

In Abbildung 2.31 wurde das Vorkommen von Sekundärmetaboliten, die im Fruchtkörper von *H. erinaceus* vorkommen, in einem Pellet aus der Submerskultur zusammengefasst. Erinacerin B war im Pellet der Submerskultur nachweisbar. Hericenon D/G bzw. Hericerin/Isohericerin waren allerdings nur in Spuren detektierbar. Wegen der gleichen Summenformel von Hericenon D/G ( $C_{37}H_{58}O_6$ ), bzw. Hericerin/Isohericerin ( $C_{27}H_{33}NO_3$ ) konnten diese nicht differenziert werden.

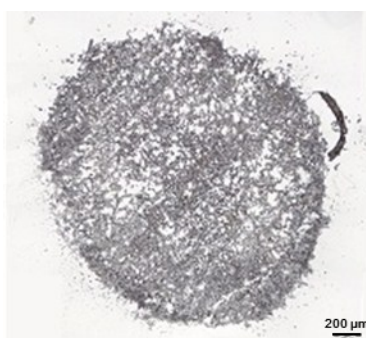


Abbildung 2.29: Ausschnitt eines Pellets (20 µm dick) aus Submerskultur von *H. erinaceus* unter dem Lichtmikroskop.

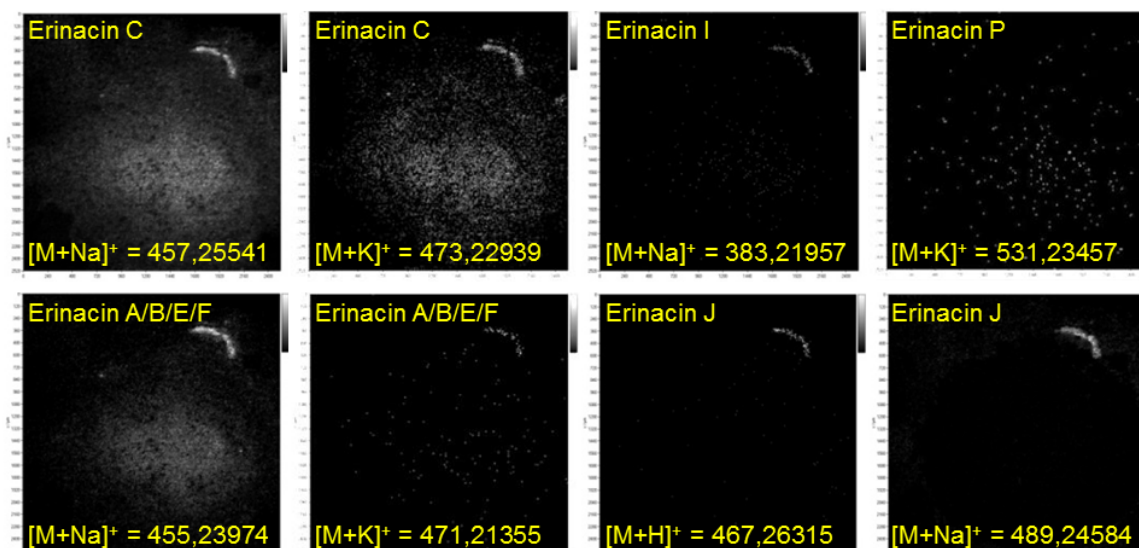


Abbildung 2.30: MALDI-MS-Imaging Verteilungsbilder der Erinacine in einem Pellet aus Submerskultur von *H. erinaceus*. Alle Angaben weisen eine Massengenauigkeit < 2 ppm und eine Pixelauflösung von 12  $\mu\text{m}$  auf.

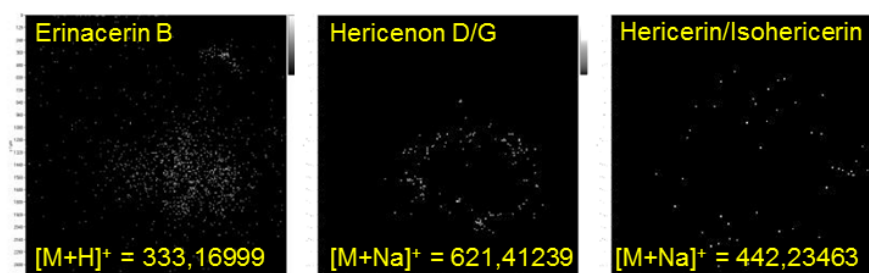


Abbildung 2.31: MALDI-MS-Imaging Verteilungsbilder der Sekundärmetabolite, die im Fruchtkörper von *H. erinaceus* vorkommen, in einem Pellet aus Submerskultur von *H. erinaceus*. Alle Angaben weisen eine Massengenauigkeit < 2 ppm und eine Pixelauflösung von 12  $\mu\text{m}$  auf.

### 2.3.1.3 Sekundärmetabolite aus Fruchtkörpern von *H. erinaceus*

Eine mikroskopische Aufnahme eines Fruchtkörperausschnitts ist in Abbildung 2.32 dargestellt. Mittels MALDI-MS-Imaging konnten die meisten in dem Reviewartikel von Ma (2010) beschriebenen Verbindungen nachgewiesen werden (Abbildung 2.33). Hericen A wurden mit der höchsten Intensität nachgewiesen und verteilte sich fast homogen über den Probenquerschnitt. Die Substanzen mit



gleicher Molekülmasse, z. B. Erinacerin A und Hericenon B ( $C_{27}H_{31}NO_4$ ), Hericenon D und G ( $C_{37}H_{58}O_6$ ), Hericenon C und F ( $C_{35}H_{54}O_6$ ), Hericenon A und I ( $C_{19}H_{22}O_5$ ), Hericenon E und H ( $C_{37}H_{54}O_6$ ) und Hericerin und Isohericerin ( $C_{27}H_{33}NO_3$ ) konnten nicht weiter differenziert werden. N-De phenylethyl isohericerin und 3-Hydroxyhericenon F konnten nur mit sehr geringer Intensität nachgewiesen werden. 1-D-Arabinol-monolinolsäure war nicht vorhanden.

Abbildung 2.34 zeigt die Verteilungsbilder der Erinacine im Fruchtkörper von *H. erinaceus*. Erinacin J war detektierbar, allerdings nur in geringer Menge. Erinacin A, B, E und F waren in Spuren nachzuweisen, aber auf Grund gleicher Molekülmassen konnten sie nicht differenziert werden. Erinacin C, D, K, P, Q und R konnten nicht nachgewiesen werden, da sie zu wenige Signalepunkte ergaben.

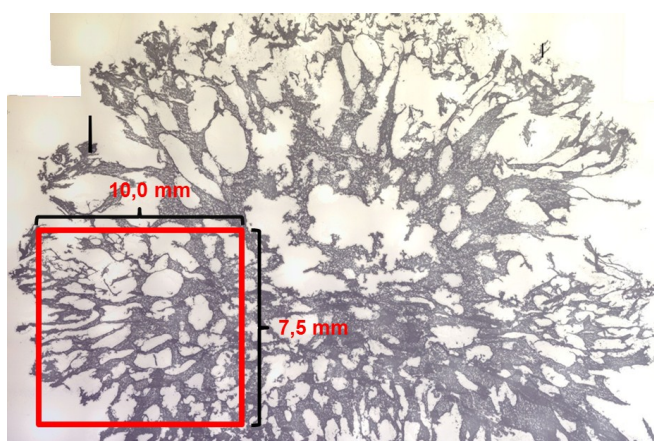


Abbildung 2.32: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Fruchtkörperausschnittes von *H. erinaceus*. Der rot markierte Bereich (10,0 mm x 7,5 mm) wurde analysiert.

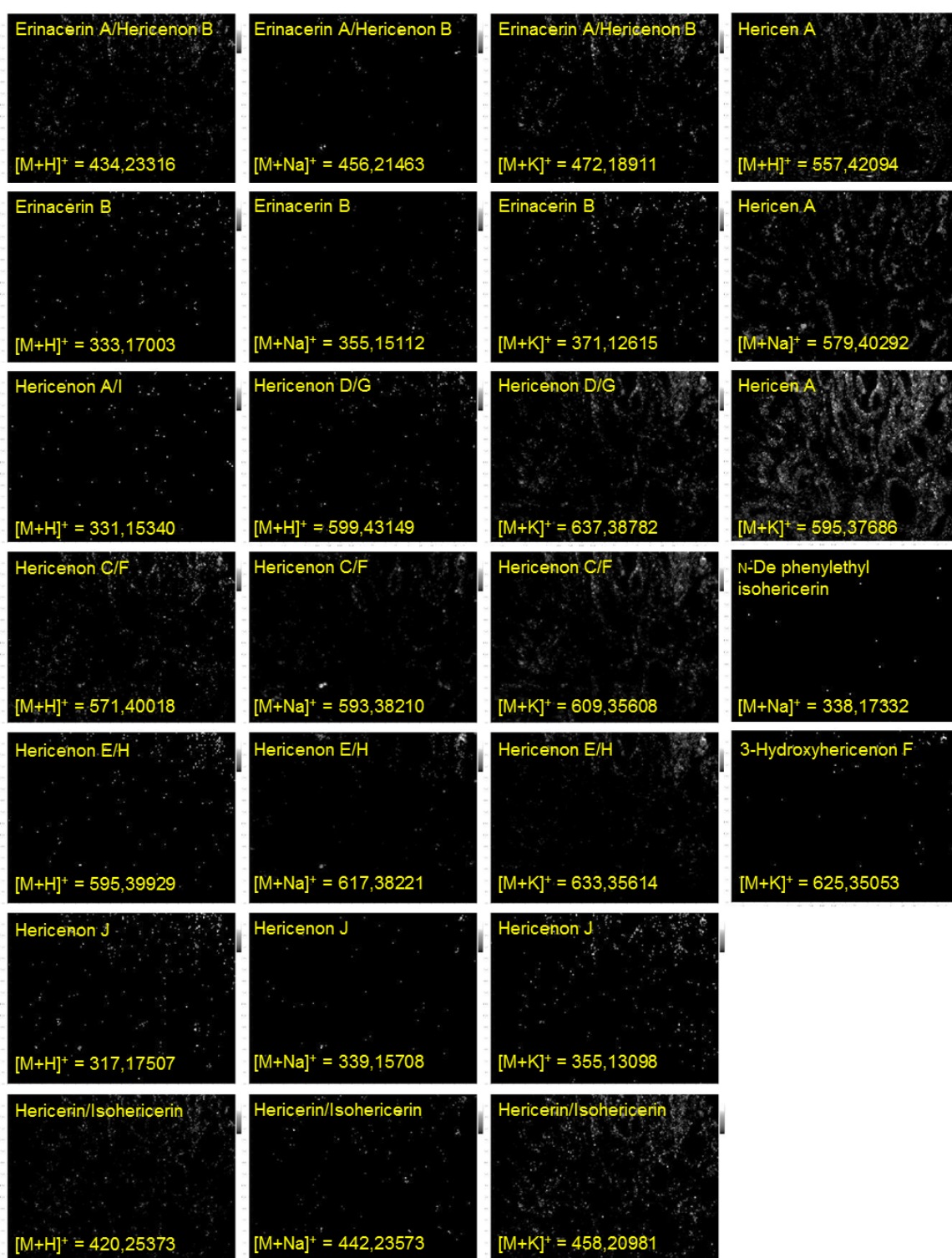


Abbildung 2.33: Verteilungsbilder der Metabolite im Fruchtkörper von *H. erinaceus* mittels MALDI-MS-Imaging. Alle Angaben weisen eine Massengenauigkeit < 2 ppm und eine Pixelauflösung von 50 µm auf.





Abbildung 2.34: Verteilungsbilder der Erinacine im Fruchtkörper von *H. erinaceus* mittels MALDI-MS-Imaging. Alle Angaben weisen eine Massengenauigkeit < 2 ppm und eine Pixelauflösung von 50 µm auf.

#### 2.3.1.4 Zusammenfassung

Sowohl für *C. striatus* als auch für *H. erinaceus* wurde mittels MALDI-MS-Imaging festgestellt, dass sich die in Submerskultur gebildeten nicht-flüchtigen Sekundärmetabolite innerhalb des Mycelpellets fast homogen verteilen. *H. erinaceus* produziert in verschiedenen Kulturformen (Submerskultur vs. Fruchtkörper) sehr unterschiedliche Sekundärmetabolite (Tabelle 2.8). Es kann vermutet werden, dass auch die Erinacine A, B, E, F und J, die Hericenone D und G, Hericerin und Isohericerin und Erinacerin B in beiden Kulturformen von *H. erinaceus* gebildet werden.

Tabelle 2.8: Mittels MALDI-MS-Imaging nachgewiesene Sekundärmetabolite in Submerskultur und Fruchtkörpern von *H. erinaceus*.

Vorläufige Zuordnung	Summenformel	Submerskultur	Fruchtkörper
Erinacin A, B, E, F	$C_{25}H_{36}O_6$	✓	✓
Erinacin K, Q	$C_{27}H_{42}O_8$		
Erinacerin A, Hericenon B	$C_{27}H_{31}NO_4$		✓
Hericenon A, I	$C_{19}H_{22}O_5$		✓
Hericenon C, F	$C_{35}H_{54}O_6$		✓
Hericenon D, G	$C_{37}H_{58}O_6$	✓	✓
Hericenon E, H	$C_{37}H_{54}O_6$		✓
Hericerin, Isohericerin	$C_{27}H_{33}NO_3$	✓	✓
Erinacin C	$C_{25}H_{38}O_6$	✓	
Erinacin D	$C_{27}H_{42}O_7$		
Erinacin I	$C_{22}H_{32}O_4$	✓	
Erinacin J	$C_{25}H_{38}O_8$	✓	✓
Erinacin P	$C_{27}H_{40}O_8$	✓	
Erinacin R	$C_{27}H_{38}O_9$		
Erinacerin B	$C_{19}H_{24}O_5$	✓	✓
Hericenon J	$C_{19}H_{24}O_4$		✓
N-De phenylethyl isohericerin	$C_{19}H_{25}NO_3$		✓
1-D-Arabinitol-monolinolsäure	$C_{24}H_{44}O_6$		
Hericen A	$C_{35}H_{56}O_5$		✓
3-Hydroxyhericenon F	$C_{35}H_{54}O_7$		✓

### 2.3.2 Zellaufschluss – *C. striatus* als Modellsystem

Der Zellaufschluss wurde angewendet, um die gebildeten Metabolite aus dem Mycelpellet freizusetzen und sie dadurch besser extrahieren zu können. Die Effizienz des Zellaufschlusses wurde anhand der Striatal (A+B)- und Proteinkonzentrationen und der mikroskopischen Betrachtung evaluiert. Abbildung 2.35 gibt einen Überblick über das Aufarbeitungsschema. Die Analysen der Proben vor dem jeweiligen Aufschlussschritt dienten als Referenzwerte (RW). Alle Ergebnisse sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

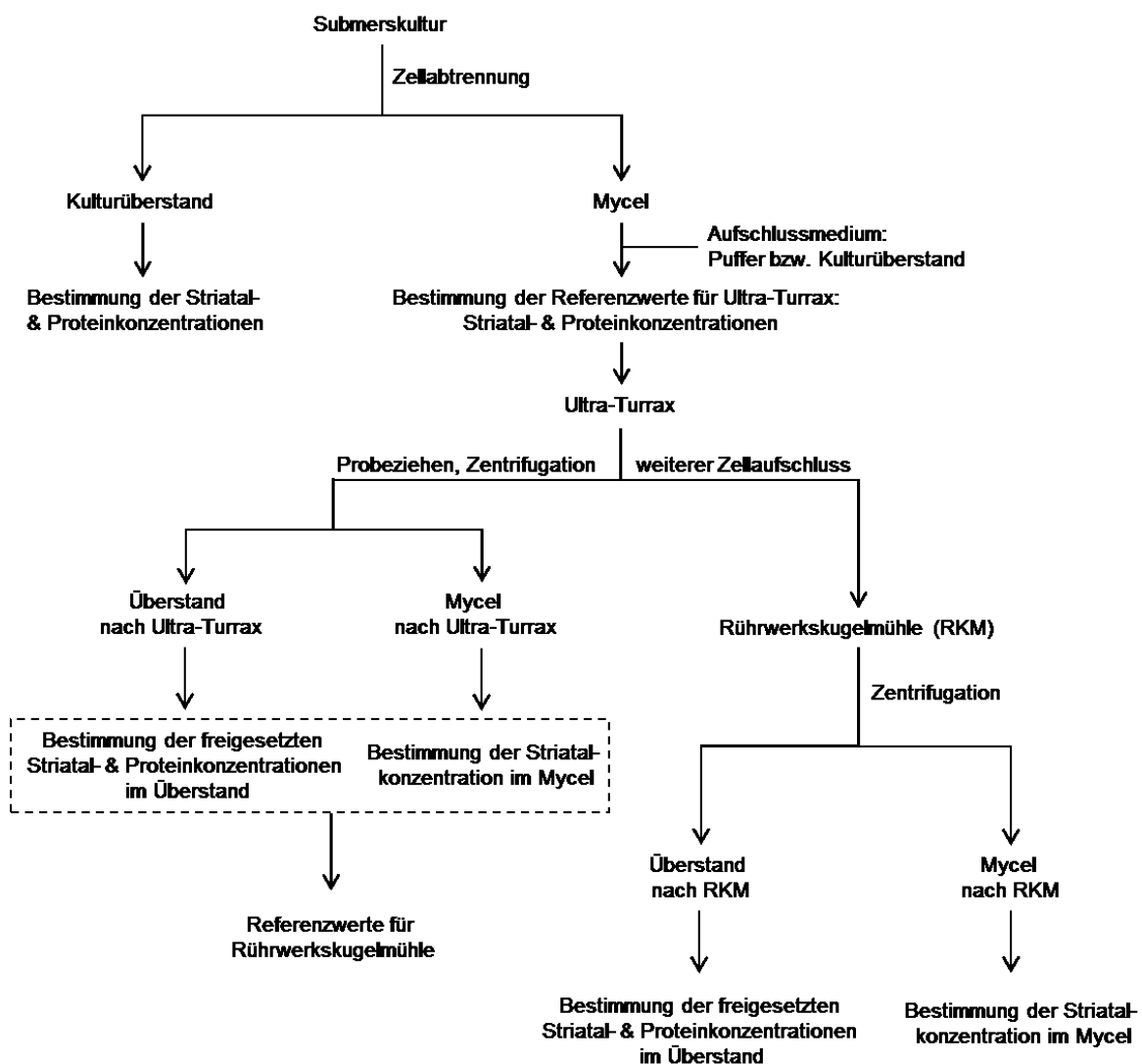


Abbildung 2.35: Aufarbeitungsschema zum Zellaufschluss.

### 2.3.2.1 Aufschlussmedium

Um zu überprüfen, ob das Aufschlussmedium einen Einfluss auf die Striatalkonzentrationen hat, wurden Aufschlüsse in Pufferlösung und direkt im Kulturüberstand durchgeführt (4.7.1). Da die Mycelpellets einen Durchmesser von 2-3 mm besaßen und der Aufschluss mittels Rührwerkskugelmühle eine Ausgangsgröße von ca. 200 µm erforderte, wurde bereits hier ein Vorversuch zur Kombination von Ultra-Turrax-Behandlung und Rührwerkskugelmühle durchgeführt. Die Parameter richteten sich nach Literatur- und Herstellerangaben. Dabei zeigte sich, dass der Zellaufschluss hinsichtlich der Striatalkonzentration im Kulturüberstand effizienter war (Abbildung 2.36). Im Gegensatz dazu war die Proteinkonzentration höher, wenn der Zellaufschluss in Pufferlösung durchgeführt wurde (Abbildung 2.37). In weiteren Versuchen wurde Pufferlösung für den Zellaufschluss eingesetzt, um die Aufschlusswirkungen auf die Freisetzung von Metaboliten und Proteinen besser analysieren zu können.

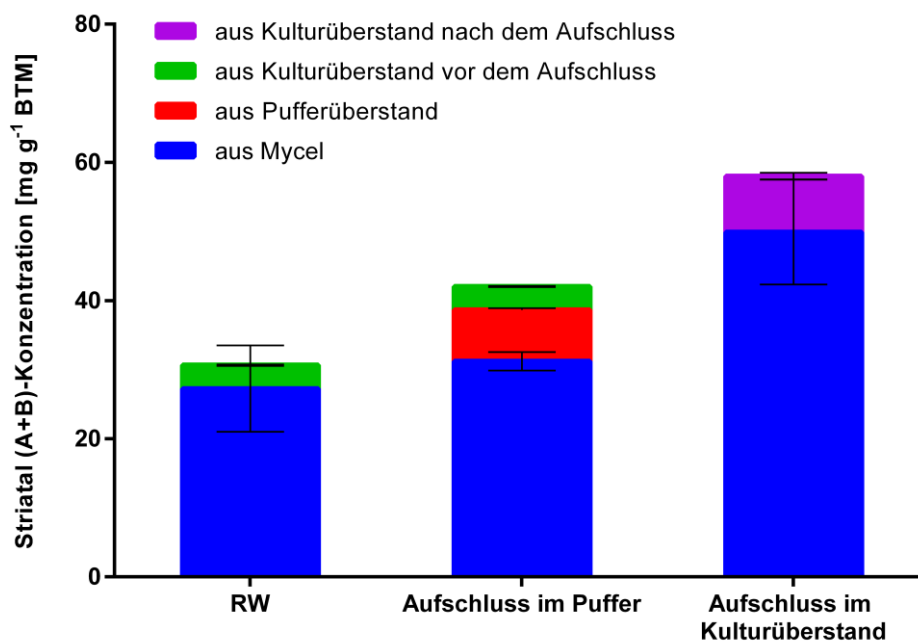


Abbildung 2.36: Striatalkonzentrationen nach Zellaufschluss. Vorhomogenisierung der Probe mittels Ultra-Turrax (15% BFM-Anteil, 15.000 rpm, 10 min) und anschließendem Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle (15% BFM-Anteil, 3.500 U min<sup>-1</sup>, 10 min, Glasperlen-Ø 0,5 mm) in Puffer und in Kulturüberstand (KÜ). Referenzwert: RW, direkte Extraktion nach Ernte. Kulturtag 12.

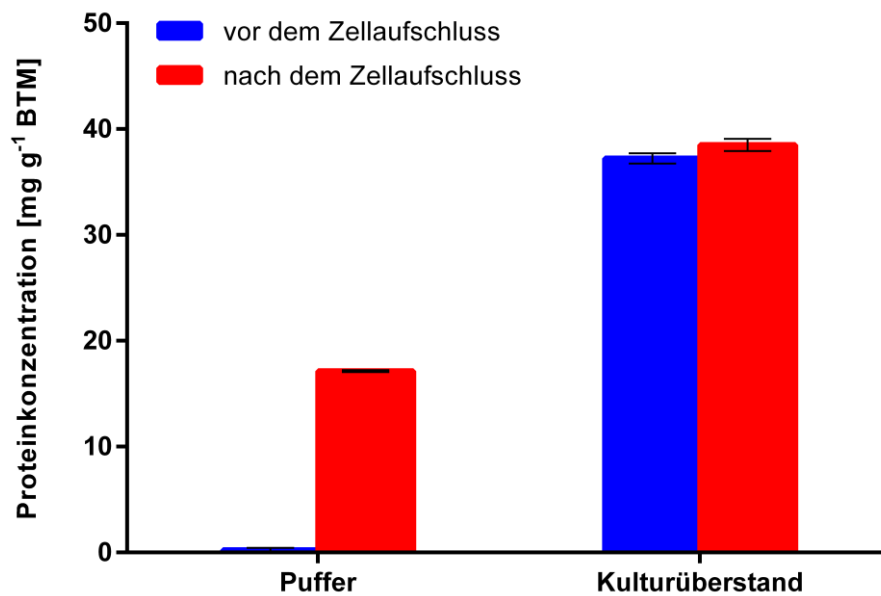


Abbildung 2.37: Proteinkonzentrationen vor und nach dem Zellaufschluss. Vorhomogenisierung der Probe mittels Ultra-Turrax (15% BFM-Anteil, 15.000 rpm, 10 min) und anschließendem Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle (15% BFM-Anteil, 3.500 U min<sup>-1</sup>, 10 min, Glasperlen-Ø 0,5 mm) in Puffer und in Kulturüberstand. Blau: Referenzwerte, direkte Extraktion nach Ernte. Kulturtag 12.

### 2.3.2.2 Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax

Die Effizienz des Zellaufschlusses unter Verwendung des Ultra-Turrax war abhängig vom BFM-Anteil (4.7.2). Die höchste Striatalkonzentration wurde bei einem BFM-Anteil von 15,0% erhalten (Abbildung 2.38). Die Proteinkonzentration war ebenfalls bei einem BFM-Anteil von 15,0% am höchsten (Abbildung 2.39).

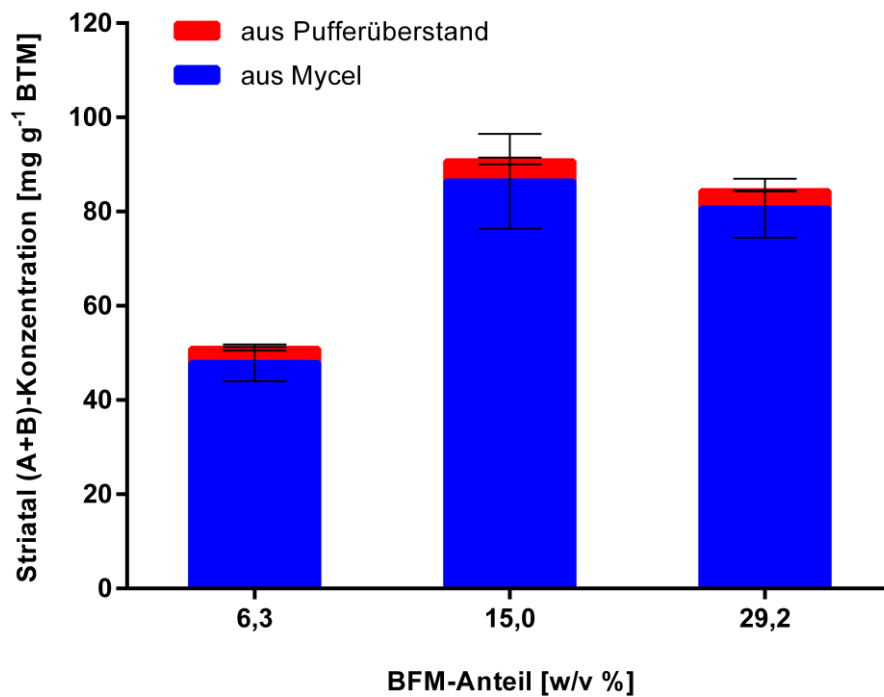


Abbildung 2.38: Striatal (A+B)-Konzentrationen nach dem Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax bei verschiedenen BFM-Anteilen (15.000 rpm, 15 min). Kulturtag 28.

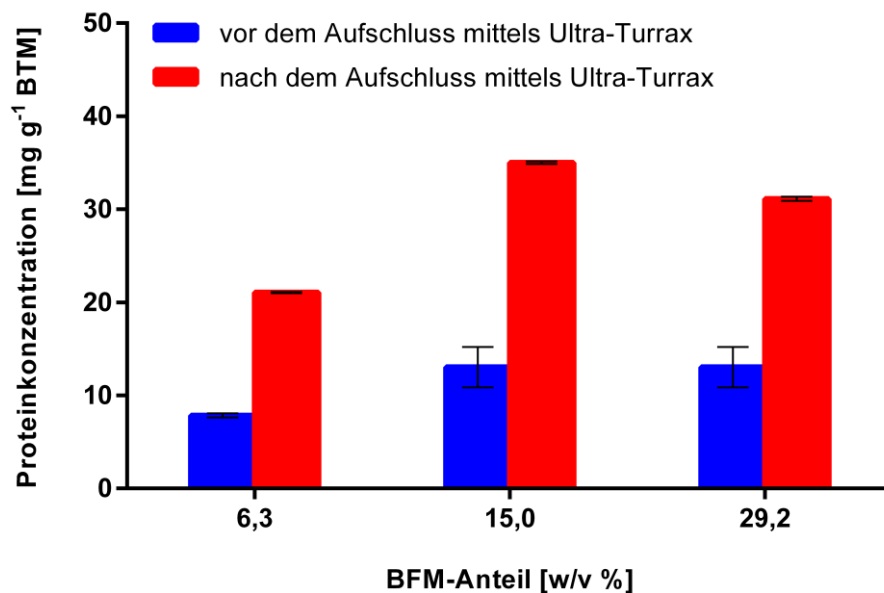


Abbildung 2.39: Proteinkonzentrationen im Puffer vor und nach dem Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax bei verschiedenen BFM-Anteilen (15.000 rpm, 15 min). Kulturtag 28.

### **2.3.2.3 Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle**

Um eine passende Ausgangsgröße (ca. 200  $\mu\text{m}$ ) der Mycelpartikel für die Verwendung der Rührwerkskugelmühle zu gewährleisten, wurde das Mycel-Puffergemisch vor dem Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle zunächst mittels Ultra-Turrax (15.000 rpm, 15 min) homogenisiert (4.7.3).

#### ***Einfluss der Zeit***

Mittels Rührwerkskugelmühle konnten sowohl die Striatalkonzentrationen als auch die Proteinkonzentrationen nach der Vorhomogenisierung nochmals gesteigert werden. Die optimale Aufschlusszeit hinsichtlich der Striatalkonzentration betrug 10 min. Das Maximum der Proteinkonzentration wurde nach 20-minütigem Aufschluss erreicht (Abbildung 2.40). Dies bedeutete eine Steigerung des Proteingehalts um 83,9% im Vergleich zum alleinigen Aufschluss mittels Ultra-Turrax.

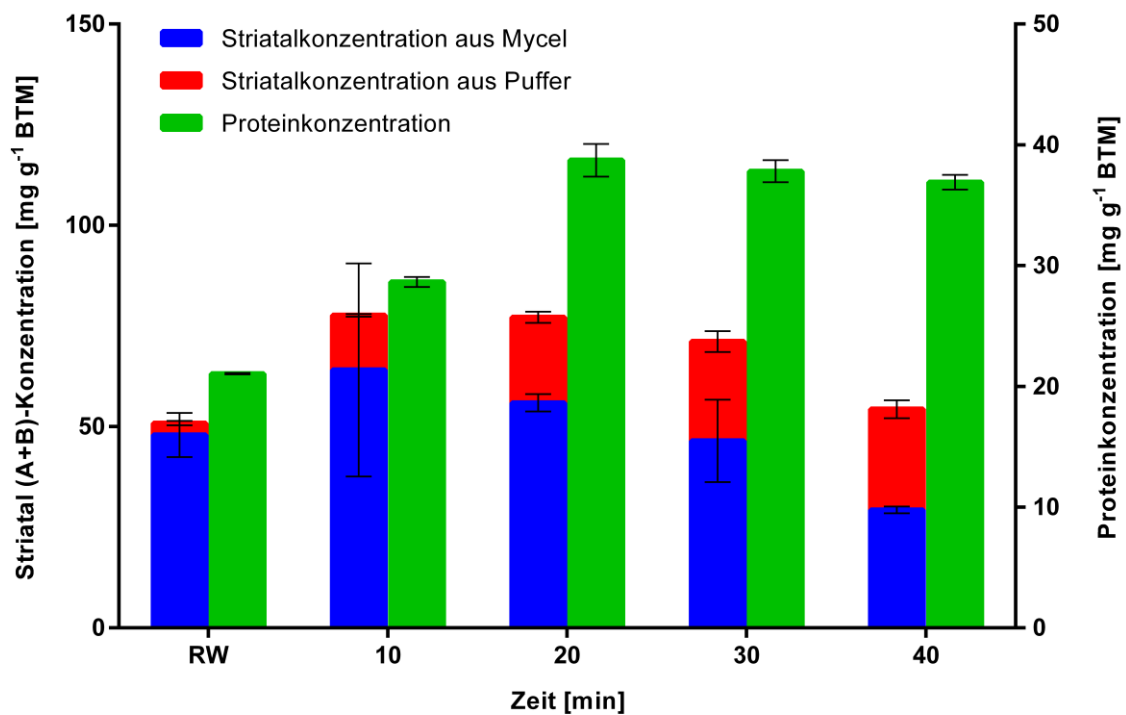


Abbildung 2.40: Striatal (A+B)- und Proteinkonzentrationen nach dem Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle in Abhängigkeit von verschiedenen Aufschlusszeiten (BFM: 6,3%,  $3.500 \text{ U min}^{-1}$ , Glasperlen-Ø 0,5 mm). RW: nach Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax (BFM: 6,3%, 15.000 rpm, 15 min), jedoch vor Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle. Kulturtag 28.



### Einfluss der Drehzahl

Sowohl die höchste Striatalkonzentration, als auch die höchste Proteinkonzentration wurden bei Verwendung der Rührwerkskugelmühle mit einer Drehzahl von 3.500 rpm erzielt. Ab 4.000 rpm wurde der Aufschlussgrad schlechter (Abbildung 2.41).

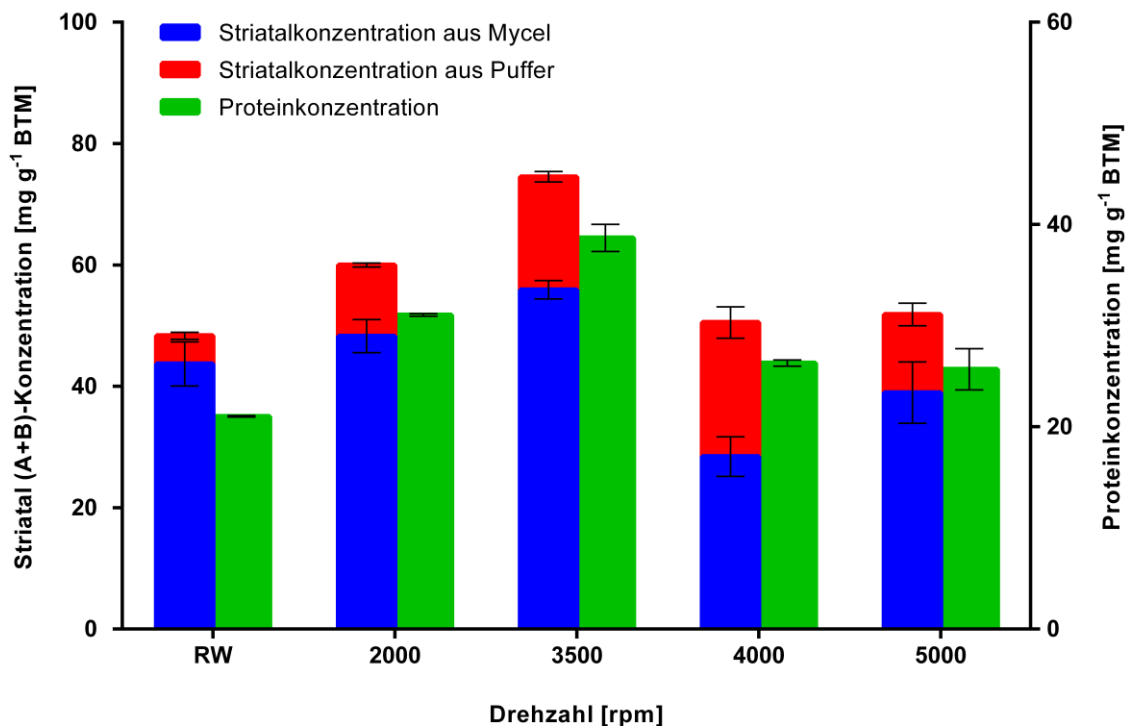


Abbildung 2.41: Striatalkonzentrationen und Proteinkonzentrationen nach dem Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle bei verschiedenen Drehzahlen (BFM: 5,5%, 20 min, Glasperlen-Ø 0,5 mm). RW: nach dem Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax (BFM: 5,5%, 15.000 rpm, 15 min), jedoch vor dem Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle. Kulturtag 28.

### Einfluss des BFM-Anteils

Bei einem BFM-Anteil von 15,0% wurde mittels Rührwerkskugelmühlen-Aufschluss die höchste Striatalkonzentration ( $131,7 \text{ mg g}^{-1} \text{ BTM}$ ) und die höchste Proteinkonzentration ( $49,7 \text{ mg g}^{-1} \text{ BTM}$ ) erreicht (Abbildung 2.42).

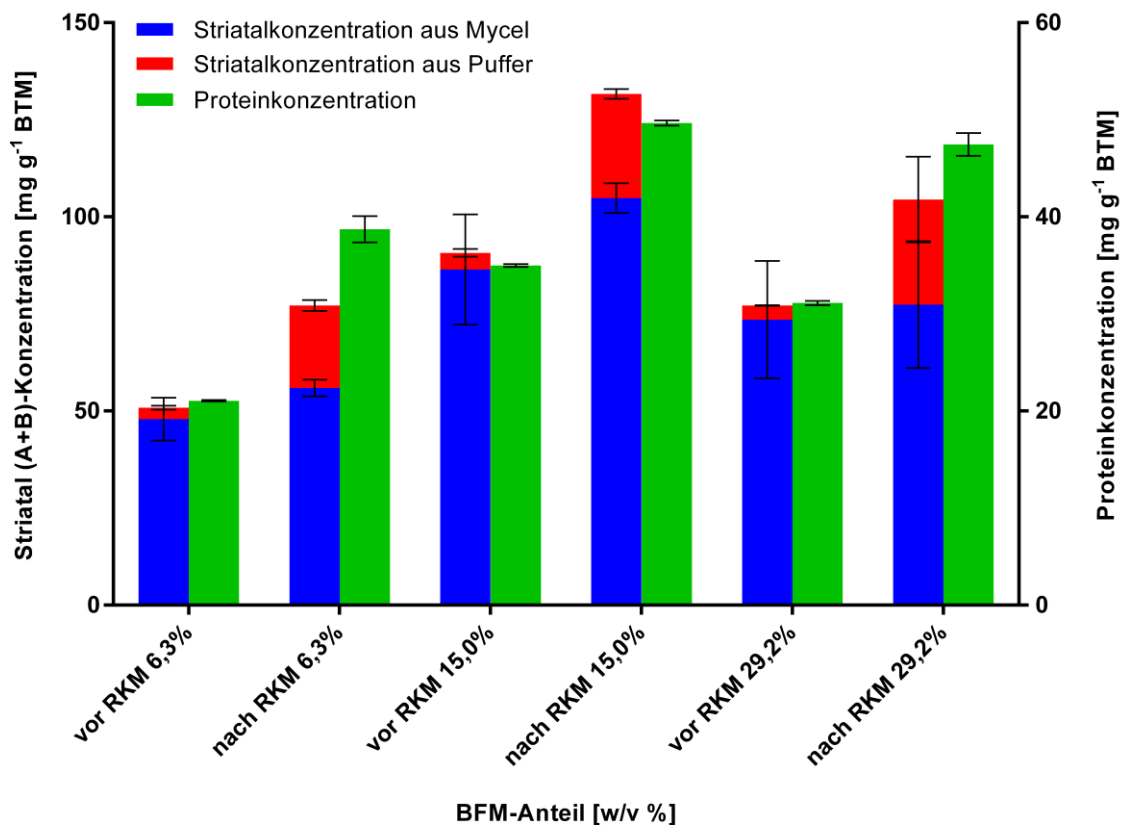


Abbildung 2.42: Striatalkonzentrationen (A+B) und Proteinkonzentrationen nach dem Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle (RKM) bei verschiedenen BFM-Anteilen ( $3.500 \text{ U min}^{-1}$ , Glasperlen-Ø 0,5 mm, 20 min). Referenzwerte, nach dem Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax ( $15.000 \text{ rpm}$ , 15 min), jedoch vor dem Zellaufschluss mittels RKM. Kulturtag 28.

### **Zusammenfassung**

Die optimalen Zellaufschlussbedingungen mittels Rührwerkskugelmühle lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Maximale Striatalkonzentration: 15% BFM-Anteil, 3.500 U min<sup>-1</sup> und 10 min;

Maximale Proteinkonzentration: 15% BFM-Anteil, 3.500 U min<sup>-1</sup> und 20 min.

#### **2.3.2.4 Lichtmikroskopie**

Die mikroskopischen Betrachtungen (Abbildung 2.43) verdeutlichen den Aufschlussgrad der Zellaufschlussmethoden Ultra-Turrax und Rührwerkskugelmühle. Im Vergleich zur Rührwerkskugelmühle sind die Hyphen der homogenisierten BFM nach 5-minütiger Behandlung mittels Ultra-Turrax kaum beansprucht und nach 15 min nur geringfügig zerkleinert. Die Zellen nach Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle wurden überwiegend zu Zellbruchstücken zerkleinert. Nur noch vereinzelt sind Hyphen mit einer Länge von ca. 20 µm zu erkennen.

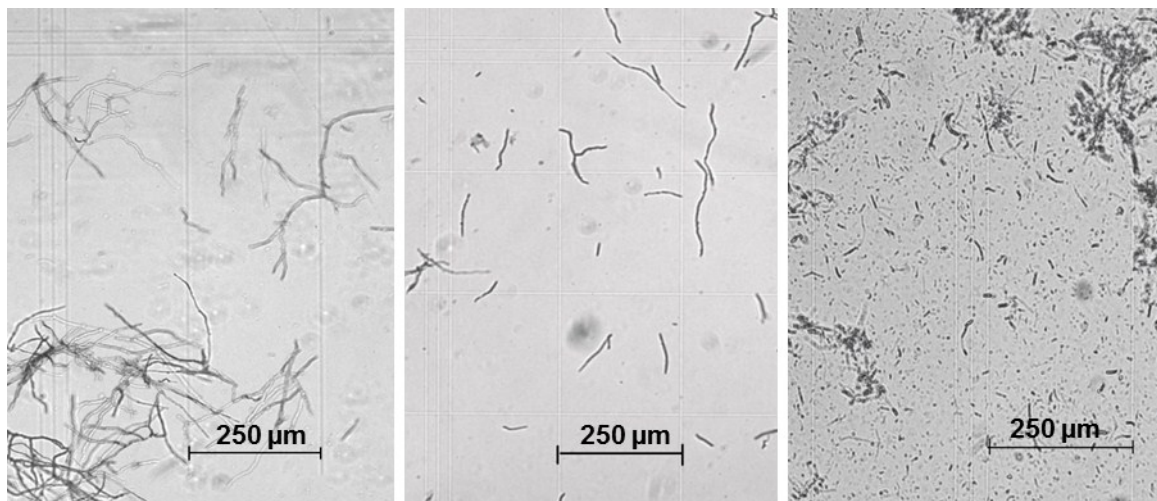


Abbildung 2.43: 20-fache Vergrößerung von aufgeschlossenem Mycel von *C. striatus*. Links: nach 5-minütiger Behandlung mittels Ultra-Turrax; Mitte: nach 15-minütiger Behandlung mittels Ultra-Turrax; rechts: nach 10-minütiger Behandlung mittels Rührwerkskugelmühle.

### 2.3.3 Übertragung der optimierten Zellaufschlussbedingungen auf *H. erinaceus*

Ausgewählte Zellaufschlussbedingungen wurden auf die Gewinnung von Erinacin C aus *H. erinaceus* übertragen (4.7.4). Auch hier wurde die höchste Konzentration an Erinacin C mit Hilfe der Rührwerkskugelmühle erzielt. Diese betragen  $49,9 \text{ mg g}^{-1} \text{ BTM}$  nach fünfminütigem Aufschluss. Dies entsprach einer Steigerung von 52,7% gegenüber der Produktkonzentration des Referenzwerts (direkt extrahierte Probe ohne Zellaufschluss) (Abbildung 2.44). Der Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle stellt sich zur Gewinnung der im Mycelpellet lokalisierten Produkte aus Basidiomyceten als am effektivsten heraus.

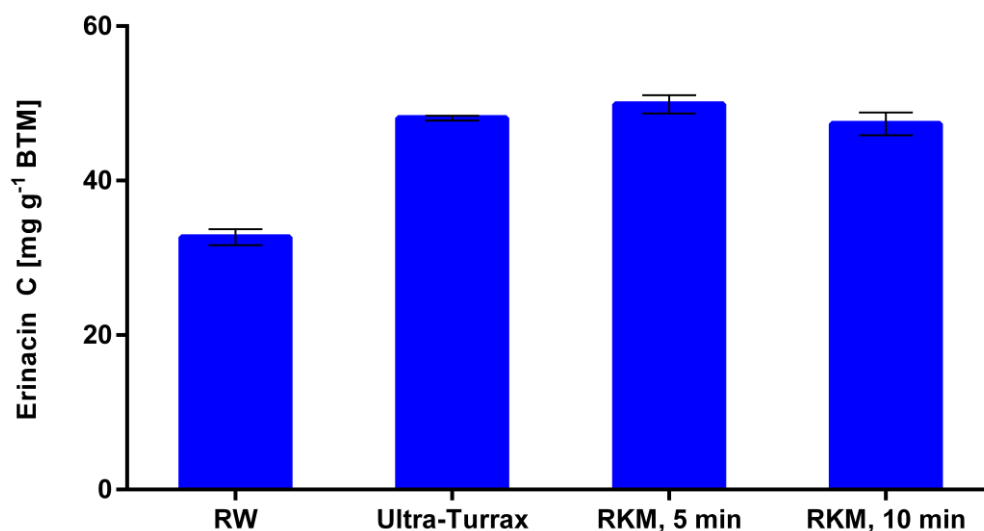


Abbildung 2.44: Wirksamkeit der angewendeten Zellaufschlussmethoden auf *H. erinaceus*. RW: direkte Extraktion nach Ernte. Ultra-Turrax: 15% BFM-Anteil, 15.000 rpm, 15 min. Rührwerkskugelmühle (RKM): 15% BFM-Anteil,  $3.500 \text{ U min}^{-1}$ , Glasperlen-Ø 0,5 mm. Kulturtag 20.

## 2.4 Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von Cyathan-Diterpenoiden

In der vorliegenden Arbeit wurde ein indirekt kompetitiver ELISA entwickelt, um Cyathan-Diterpenoide nachzuweisen.

### 2.4.1 Produktion von Antikörpern

Die Produktion der Antikörper gegen ein Gemisch aus Striatal A/B (1/1, w/w) wurde von der Firma Eurogentec S.A (Belgien) durchgeführt. In Abbildung 2.45 sind die Massenspektren vor und nach der Herstellung der Striatal A/B-BSA-Konjugate dargestellt. An ein BSA-Molekül wurden ca. 17 Striatal-Moleküle gekoppelt. Mit dem Striatal A/B-BSA-Konjugat wurden dann zwei Kaninchen immunisiert, um spezifisch gegen Striatal gerichtete Antikörper herzustellen (Tabelle 4.39).

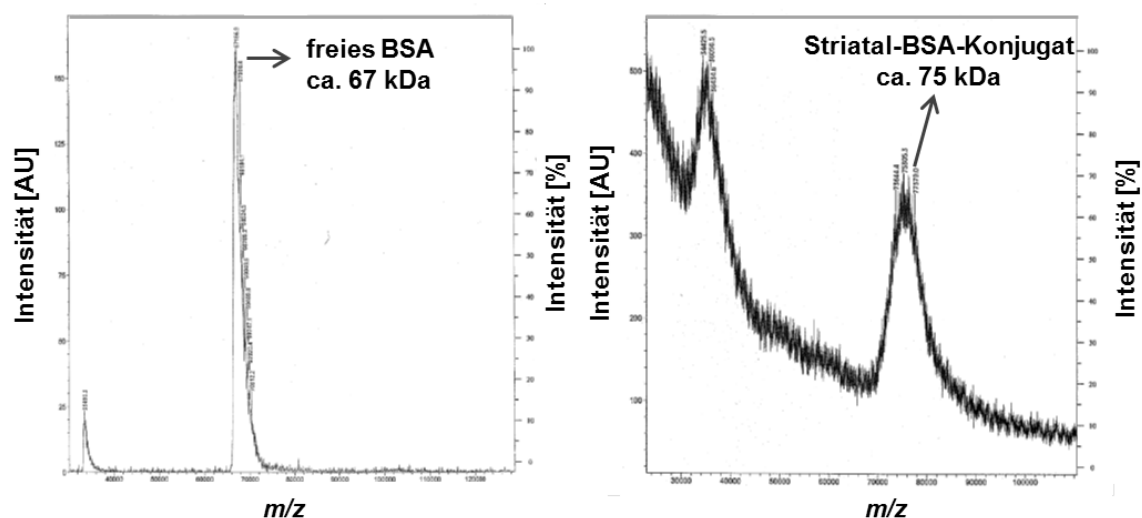


Abbildung 2.45: MALDI-TOF-Massenspektren. Freies BSA (Trägerprotein) mit  $m/z = 67$  kDa vor der Konjugatherstellung (links) und Striatal A/B-BSA-Konjugat mit  $m/z = 75$  kDa nach der Konjugatherstellung (rechts).

## 2.4.2 Stabilität der Striatale

Um einen optimalen Beschichtungspuffer zu finden, wurde zunächst die Stabilität von Striatal B in verschiedenen Puffern überprüft. Dies erfolgte durch die Wiederfindung von zugesetztem Striatal B in Dimethylsulfoxid (DMSO)/Puffer (1/1, v/v)-Gemisch bei verschiedenen pH-Werten mittels HPLC-DAD. Von pH 1,0 bis pH 6,0 war Striatal B vollständig löslich (visuelle Überprüfung). Ab pH 6,5 wurde die Bildung von Kristallnadeln beobachtet. Zwischen pH 4,0 und 4,5 erwies sich Striatal B als am stabilsten (Abbildung 2.46). Die geringere Wiederfindung von Striatal B ist bei höheren pH-Werten (6,5-9,5) partiell durch eine zu geringe Löslichkeit zu erklären. Bei der Wiederfindung von Striatal B spielt neben dem pH-Wert auch ein Zeitfaktor eine Rolle, wie durch HPLC-Messungen bestätigt wurde. Nach 11 h Lagerung im DMSO/Puffer-Gemisch wurden deutlich geringere Striatal B-Konzentrationen detektiert als nach 3-stündiger Lagerung. Zur Optimierung der Beschichtung von Striatal B wurde ein Beschichtungspuffer mit pH 4,0, 7,4 und 9,5 ausgewählt.

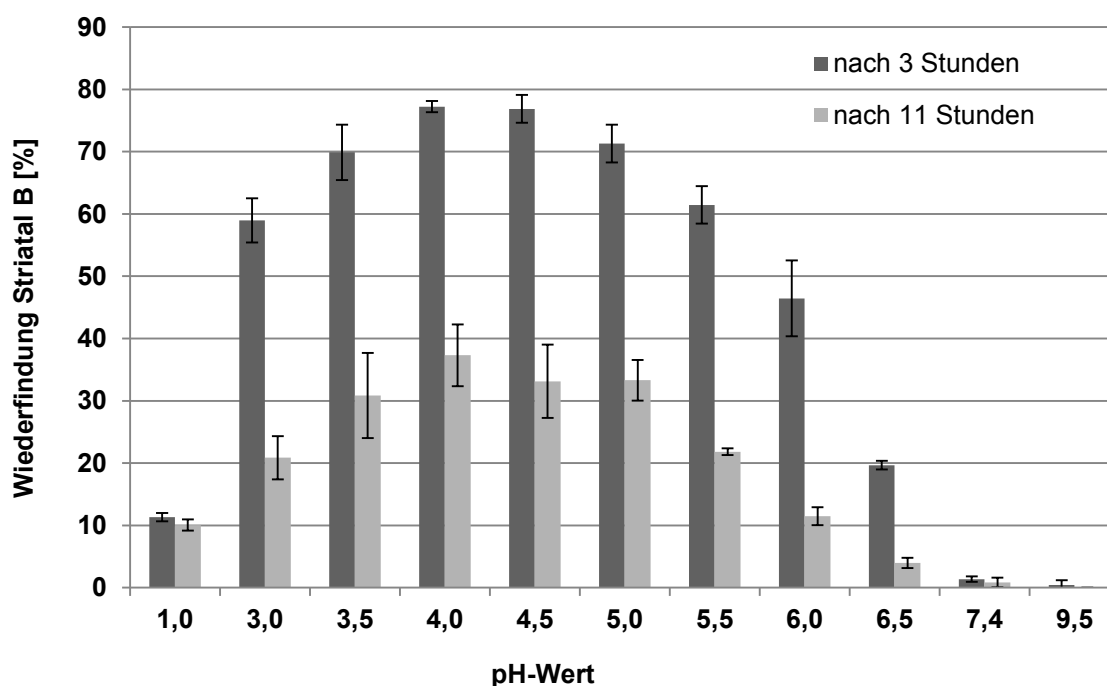


Abbildung 2.46: Wiederfindung von Striatal B in DMSO/Puffer (1/1, v/v) mittels HPLC-DAD.

### 2.4.3 Optimierung der Beschichtungsbedingungen

Der ELISA wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Zur Optimierung der Beschichtungsbedingungen wurde ein indirekter nicht kompetitiver ELISA eingesetzt. Die Durchführung eines indirekten ELISA kann grob in sechs Schritte unterteilt werden: Beschichtung, Blockierung, Reaktion mit der Primärantikörper, Reaktion mit der Sekundärantikörper, Farbreaktion und Messung. Zur Beschichtung wurde Striatal B verwendet, da Striatal B eine OH-Gruppe mehr als Striatal A besitzt. Somit sollte eine bessere passive Adsorption der Plattenoberfläche stattfinden. Alle Werte wurden mindestens durch eine Doppelbestimmung ermittelt.

#### *Optimaler Beschichtungspuffer*

Verschiedene Puffer wurden zur Beschichtung getestet. PBS stellt sich als am besten geeigneter Beschichtungspuffer heraus, da hier eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Striatal B-Konzentration und der Extinktion zu erkennen war. Dies war bei den anderen Puffern nicht der Fall (Abbildung 2.47).

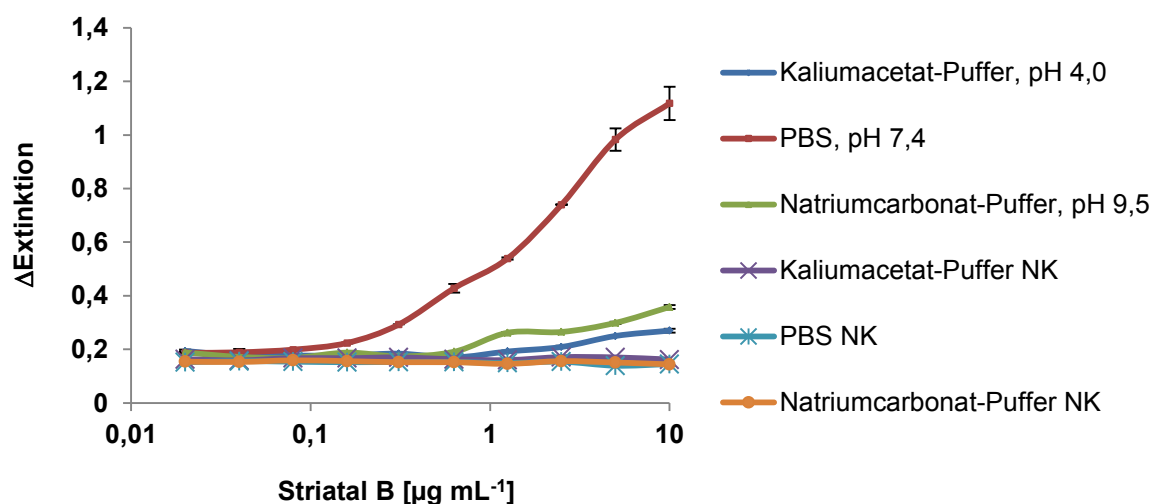


Abbildung 2.47: Auswahl des Beschichtungspuffers. Plattenmaterial: Maxisorp. NK: Negativkontrolle (Serum vor der Immunisierung). Temperatur: 24°C. Beschichtungsdauer: 16 h. Verdünnung der Primärantikörper: 1:100.  $\Delta$ Extinktion: Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm.

### Auswahl der Mikrotiterplatte

In Abbildung 2.48 sind die Extinktionen in Abhängigkeit von der Striatal B-Konzentration auf verschiedenen Plattenmaterialien mit PBS als Beschichtungspuffer dargestellt. Als Plattenmaterial wurde Maxisorp ausgewählt, da auf Maxisorp Platten mit PBS die höchsten spezifischen Signale erzielt werden konnten.

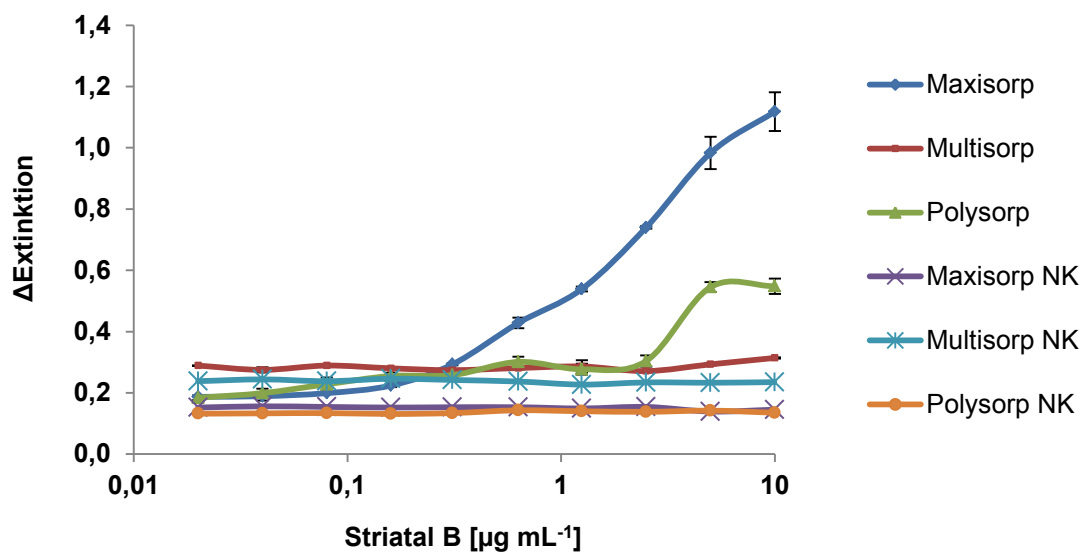


Abbildung 2.48: Auswahl des Plattenmaterials. Beschichtungspuffer: PBS. NK: Negativkontrolle (Serum vor der Immunisierung). Temperatur: 24°C. Beschichtungsdauer: 16 h. Verdünnung der Primärantikörper: 1:100.  $\Delta\text{Extinction}$ : Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm.



### Optimierung der Temperatur

Standardtemperaturen bei der Beschichtung von ELISA sind 4°C im Kühlschrank, Raumtemperatur und 37°C. Deshalb wurden diese Temperaturen für den zu entwickelnden ELISA evaluiert. Die Ergebnisse der Temperaturabhängigkeit bei der Beschichtung über Nacht sind in Abbildung 2.49 dargestellt. Bei 4 °C waren die Extinktionen etwas niedriger als bei einer Beschichtungstemperatur von 24 °C oder 37 °C. In allen weiteren Versuchen wurde die Beschichtung deshalb bei 24 °C durchgeführt.

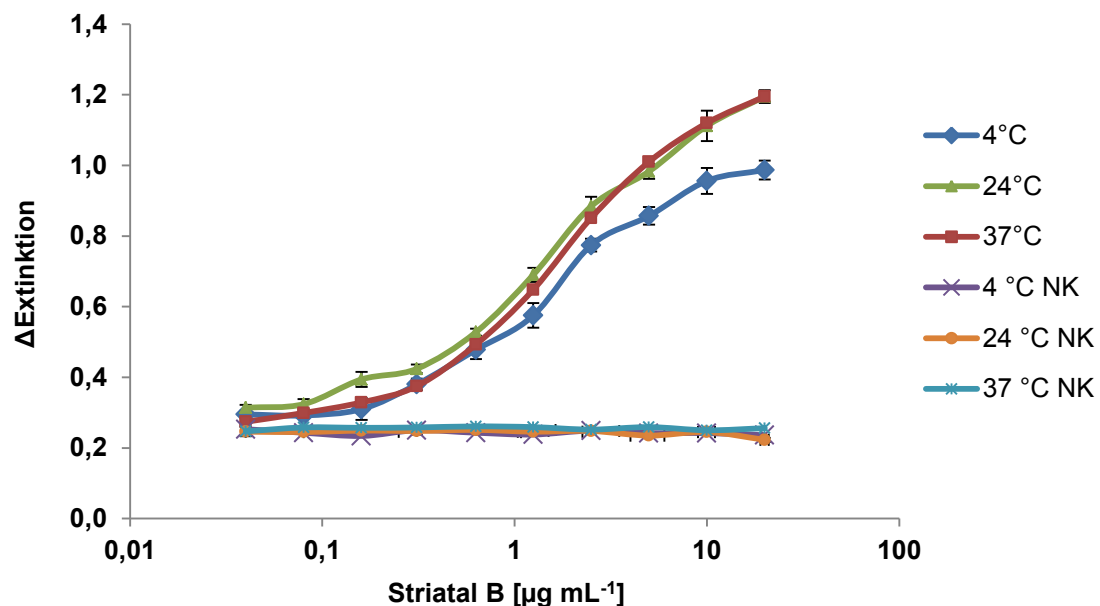


Abbildung 2.49: Einfluss der Beschichtungstemperatur. Plattenmaterial: Maxisorp. Beschichtungspuffer: PBS. NK: Negativkontrolle (Serum vor der Immunisierung). Beschichtungsdauer: 16 h. Verdünnung der Primärantikörper: 1:100.  $\Delta\text{Extinction}$ : Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm.

### Optimierung der Beschichtungsdauer

Bei einer Beschichtung für 16 h war das spezifische Signal signifikant höher als bei einer Beschichtungsdauer von zwei Stunden (Abbildung 2.50). In allen weiteren Versuchen wurde eine Beschichtungsdauer von 16 h ausgewählt.

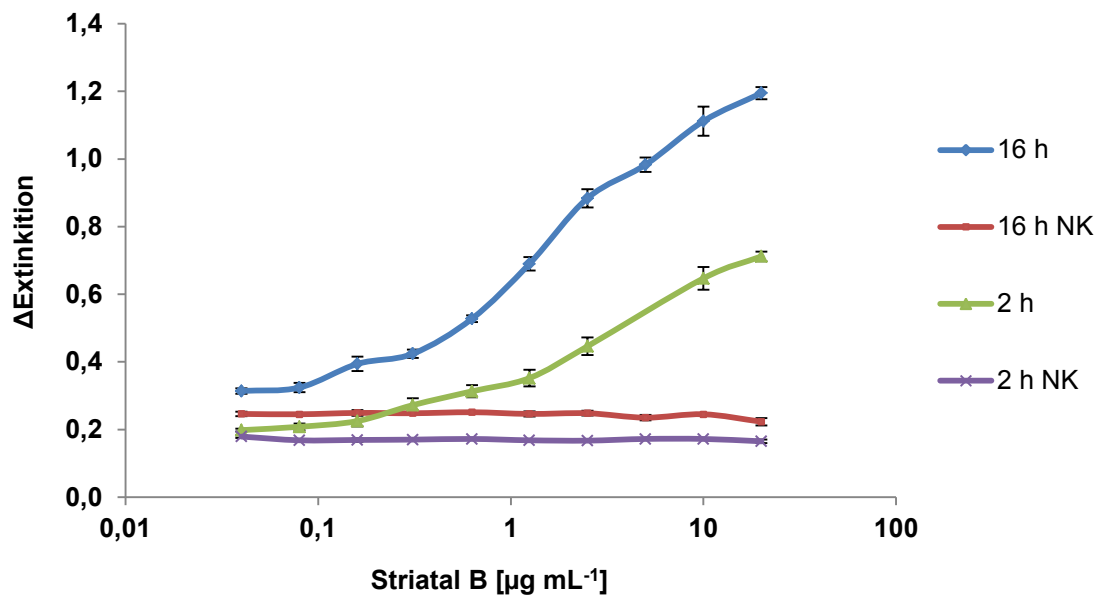


Abbildung 2.50: Einfluss der Beschichtungsdauer. Plattenmaterial: Maxisorp. Beschichtungspuffer: PBS. NK: Negativkontrolle (Serum vor der Immunisierung). Temperatur: 24°C. Verdünnung der Primärantikörper: 1:100.  $\Delta\text{Extinction}$ : Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm.

### 2.4.4 Optimierung der Blockierung

In Abbildung 2.51 sind die Extinktionen in Abhängigkeit von der Striatin B-Konzentration bei einer Blockierung mit 1%iger Gelatine bzw. mit 5%igem Milchpulver dargestellt. Die Blockierung mit Gelatine lieferte ein wesentlich niedrigeres Hintergrundsignal als die Blockierung mit Milchpulver. Dadurch wird der Assay deutlich sensitiver. Aus diesem Grund wurde 1%ige Gelatine für die Blockierung ausgewählt.

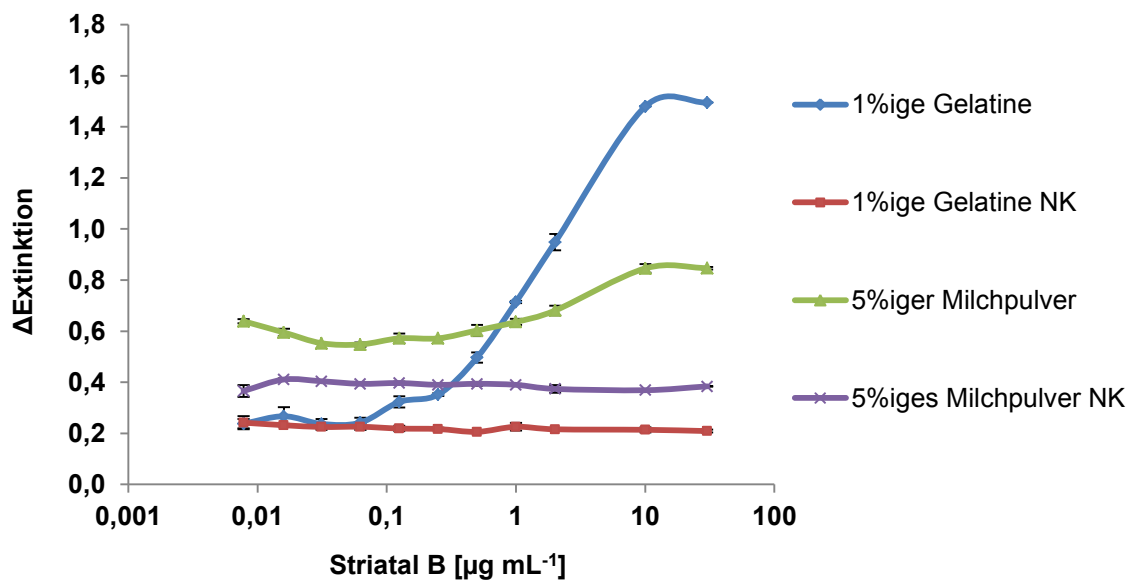


Abbildung 2.51: Auswahl des Blockierungsproteins. Plattenmaterial: Maxisorp. Beschichtungspuffer: PBS. Temperatur: 24°C. Beschichtungsdauer: 16 h. NK: Negativkontrolle (Serum vor der Immunisierung). Verdünnung der Primärantikörper: 1:100.  $\Delta\text{Extinktion}$ : Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm.

## 2.4.5 Checkerboard -Titerbestimmung

Um die geeignete Verdünnung der Primärantikörper auszuwählen, wurde der Titer mittels *Checkerboard* bestimmt (Tabelle 2.9). Eine graphische Darstellung der Ergebnisse ist Abbildung 2.52 zu entnehmen. Eine Beschichtungskonzentration von  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  Striatal B und eine Primärantikörper-Verdünnung von 1:200 stellten sich als optimal heraus. Diese wurden in weiteren Versuchen eingesetzt.

Tabelle 2.9: Titerbestimmung mittels *Checkerboard*-Titration. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung von  $\Delta\text{Extinktionen}$  (Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm). PAK: Primärantikörper. **Blau**:  $\Delta\text{Extinktion} \approx 1$ ; **Rot**: ausgewählte Titerbedingungen.

Striatal B [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	0,04	0,08	0,16	0,31	0,62	1,25	2,5	5	10	20
PAK 1:50	0,384	0,411	0,538	0,721	0,844	1,072	1,220	1,323	1,371	1,438
PAK 1:100	0,298	0,342	0,444	0,610	0,714	0,905	1,060	1,229	1,262	1,303
PAK 1:200	0,265	0,280	0,355	0,481	0,567	0,715	0,873	1,012	1,083	1,111
PAK 1:400	0,234	0,236	0,285	0,354	0,438	0,581	0,724	0,841	0,904	0,928
PAK 1:800	0,212	0,213	0,245	0,312	0,362	0,503	0,576	0,683	0,713	0,729
PAK 1:1600	0,197	0,205	0,217	0,253	0,290	0,372	0,431	0,509	0,524	0,527
PAK 1:3200	0,179	0,190	0,200	0,227	0,246	0,294	0,339	0,389	0,390	0,390
PAK 1:6400	0,176	0,178	0,184	0,233	0,200	0,233	0,259	0,281	0,280	0,283

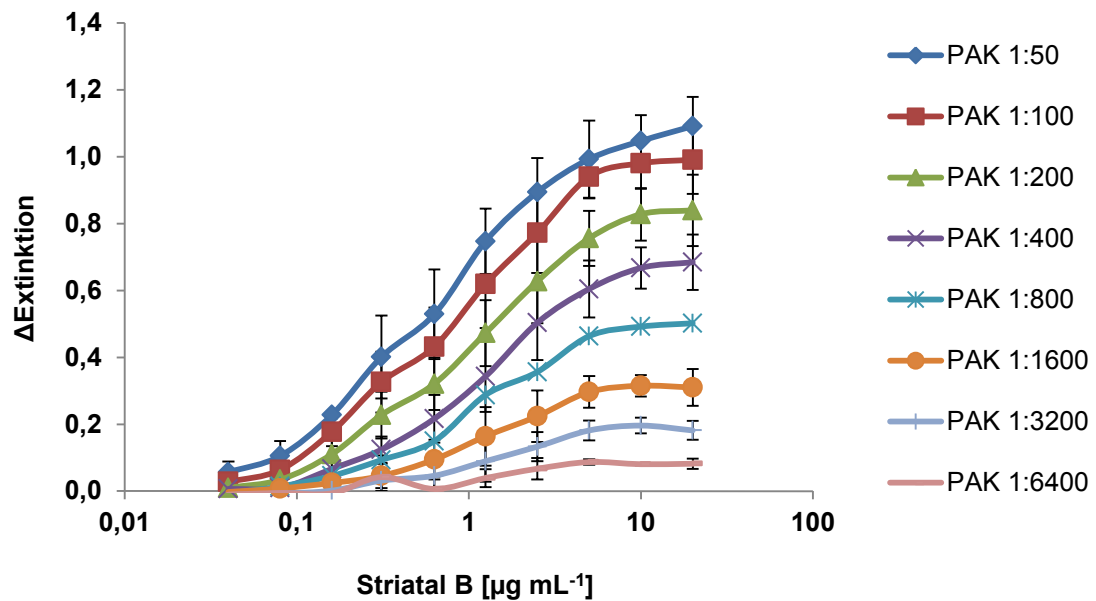


Abbildung 2.52: Titerbestimmung mittels *Checkerboard*-Titration. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung abzüglich der Negativkontrolle. Plattenmaterial: Maxisorp. Beschichtungspuffer: PBS. Temperatur: 24°C. Beschichtungsdauer: 16 h. Blockierungsprotein: 1%ige Gelatine.  $\Delta\text{Extinction}$ : Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm.

### 2.4.6 Zusammenfassung der optimierten ELISA-Bedingungen

Die optimalen Bedingungen für den etablierten ELISA sind in Tabelle 2.10 zusammengefasst. Alle weiteren Versuche wurden mit diesen festgelegten Parametern durchgeführt.

Tabelle 2.10: Assayparameter ELISA.

Plattenmaterial	Maxisorp
Beschichtungspuffer	DMSO/PBS pH 7,4, 1/1, v/v
Beschichtungskonzentration	5 µg mL <sup>-1</sup> Striatal B
Beschichtungstemperatur	24°C
Beschichtungsdauer	über Nacht, in der Regel 16 h
Blockierungsprotein	1%tige Gelatine
Verdünnung der Primärantikörper	1:200

### 2.4.7 Lagerstabilität der beschichteten und blockierten Mikrotiterplatten

Um zu überprüfen, wie lange die fertig beschichtete und blockierte Mikrotiterplatte stabil bleibt, wurden fünf Platten beschichtet und blockiert. Nach der Blockierung wurden die Platten mit Alufolie verschlossen und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Das spezifische Signal der gelagerten Platten war etwas niedriger als bei der direkt bearbeiteten Platte. Eine Abnahme des spezifischen Signals tritt nach einer Lagerzeit von zwei Tagen auf, danach spielte die Lagerzeit nur eine geringe Rolle (Abbildung 2.53).

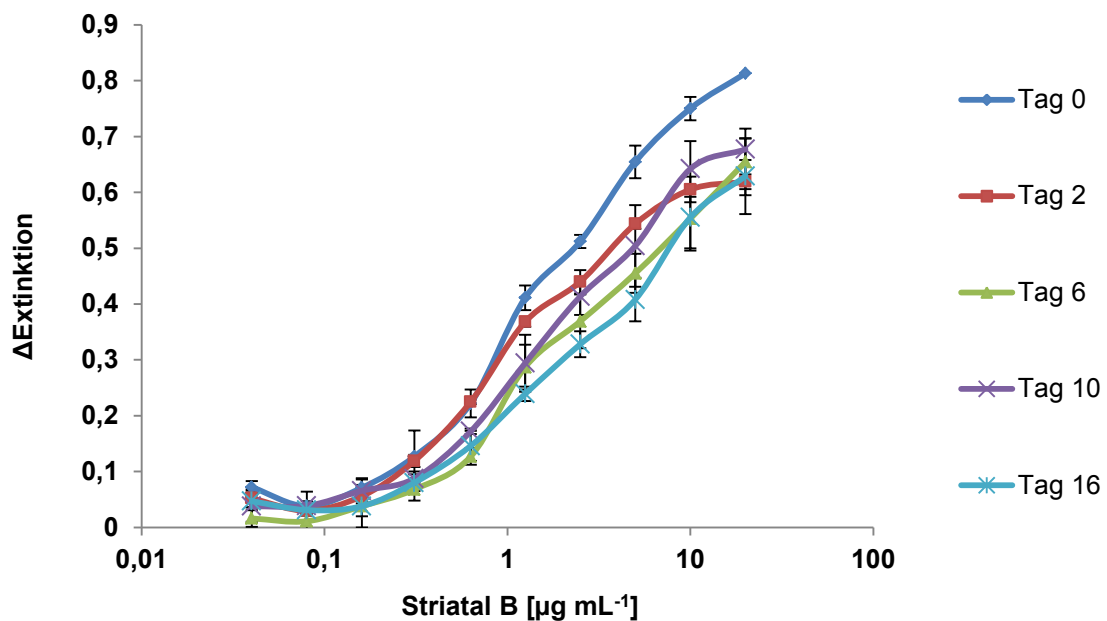


Abbildung 2.53: Lagerstabilität der beschichteten und blockierten Mikrotiterplatten. Dargestellt sind die Mittelwerte abzüglich der Negativkontrolle. Plattenmaterial: Maxisorp. Beschichtungspuffer: PBS. Temperatur: 24°C. Beschichtungsdauer: 16 h. Blockierungsprotein: 1%ige Gelatine. Lagerung bei 4°C im Dunkeln.  $\Delta\text{Extinction}$ : Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm.

## 2.4.8 Indirekter kompetitiver ELISA

### 2.4.8.1 Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln im kompetitiven ELISA

Wegen der besseren Löslichkeit der Striatine, Striatine und Erinacine wurden dem Präinkubationspuffer (PBST) organische Lösungsmittel (DMSO, Acetonitril und Methanol) zugesetzt. Ein Zusatz von 5% bis 10% (v/v) DMSO war tolerierbar. Höhere Anteile führten zu einer Abnahme der Extinktion. Ab einem DMSO-Zusatz von 40% stieg das Signal wieder an. Bei Methanol konnte bis zu 25% zugesetzt werden, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung des spezifischen Signals kam. Acetonitril konnte bis zu 10% zu den Primärantikörpern dosiert werden. Ab einem Zusatz von 25% Acetonitril traten steigende Signale auf (Abbildung 2.54). In den

weiteren Versuchen zur Bestimmung von Kreuzreaktivitäten wurden deshalb 5% Acetonitril oder 5% DMSO für die Präinkubation verwendet. Methanol konnte wegen der Umwandlungsreaktion von Striatol zu Striatin trotz seines geringen negativen Einflusses auf dem Assay nicht genutzt werden.

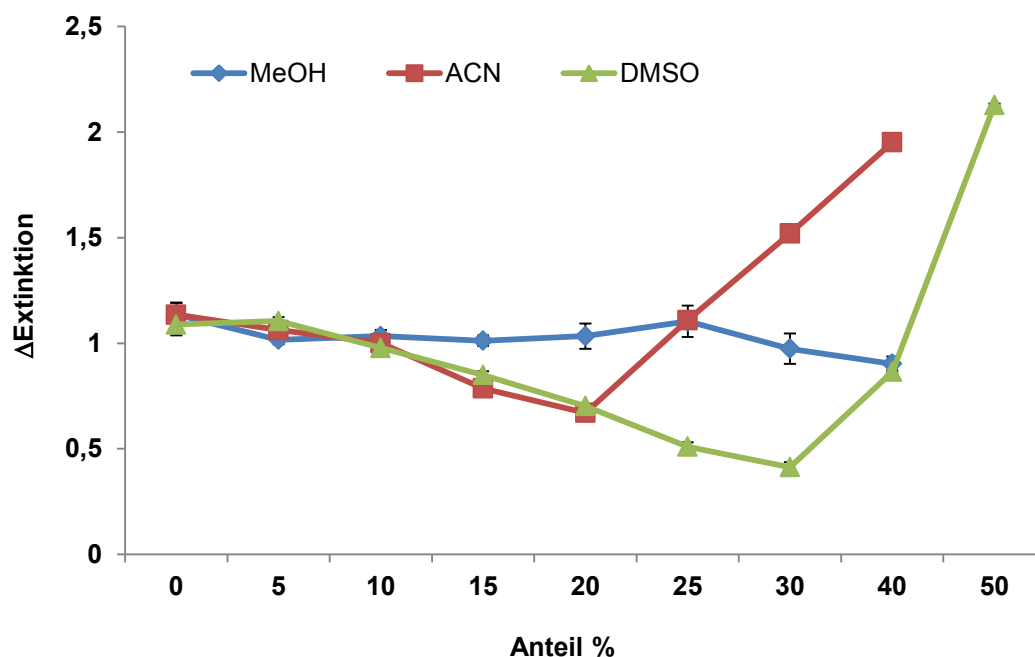


Abbildung 2.54: Einfluss von Dimethylsulfoxid (DMSO), Acetonitril (ACN) und Methanol (MeOH) auf die Antigen-Antikörper-Reaktion.  $\Delta\text{Extinction}$ : Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm.

#### 2.4.8.2 Spezifität des Assays / Kreuzreaktivitäten

Die Untersuchung zur Spezifität der polyklonalen Antikörper erfolgte durch die Bestimmung der Kreuzaktivitäten einiger strukturverwandter Substanzen. Für Striatol A, C, D erfolgten die Versuche unter Zusatz von 5% DMSO zur Präinkubationslösung. Bei den Striatinen A und B sowie Erinacinen C und P wurden der Präinkubationslösung 5% Acetonitril zugesetzt. Nach 4.9.7 wurden die Linearbereiche aller getesteten Substanzen graphisch dargestellt. Für jeden Versuch wurde der Striatol B Standard neu kalibriert, um Fehler zwischen den Versuchsreihen auszuschließen. Abbildung 2.55 stellt beispielhaft eine Kalibrier-



gerade für Striatal B dar. Tabelle 2.11 fasst die Kreuzreaktivitäten gegen Striatal B zusammen. Striatin B zeigte mit 109,3% die höchste Kreuzreaktivität. Erinacin P konkurrierte mit Striatal B mit 21,1% am geringsten.

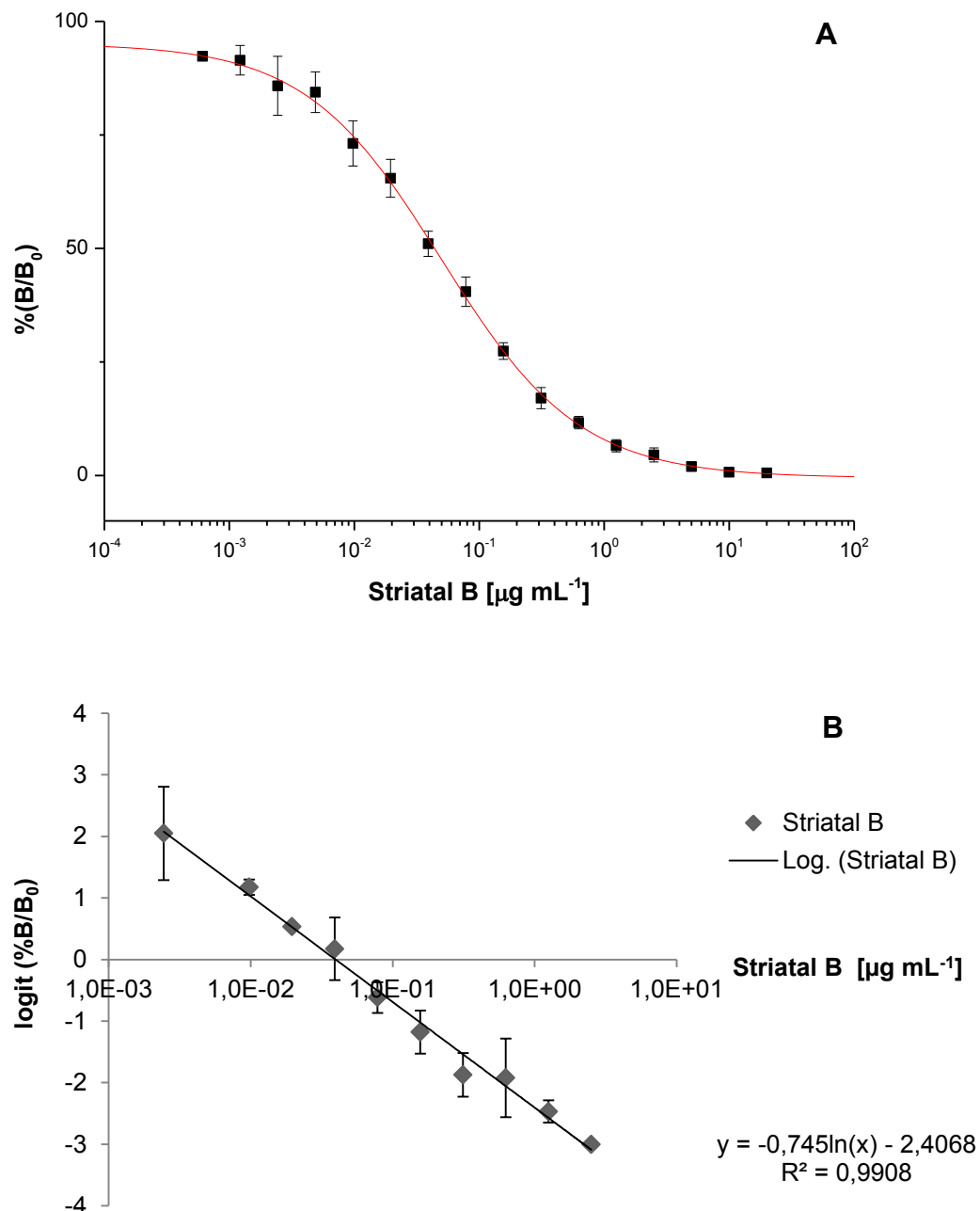


Abbildung 2.55: Beispiel für die Erstellung einer Kalibrierfunktion für Striatal B. A. Sigmoidale Kurve. B. Linearisierung der sigmoiden Kurve durch eine Logit Funktion.  $y = -0,745 \ln(x) - 2,4068$ ,  $R^2 = 0,9908$ ,  $IC_{50} = 39,5 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Tabelle 2.11: Kreuzreaktivitäten der strukturverwandten Substanzen.

Substanz	Kreuzreaktivität [%] *
Striatal B	100,0
Striatal A	39,8
Striatal C	77,8
Striatal D	74,4
Striatin A	24,1
Striatin B	109,3
Erinacin C	60,0
Erinacin P	21,1

\* bezogen auf die Stoffmengenkonzentration.

#### 2.4.8.3 Linearität des ELISA

Die Linearität des ELISA wurde durch Verdünnen einer Standardlösung bestimmt. Der Präinkubationspuffer (5% ACN in PBST) wurde mit Striatal B in einer Konzentration von  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  dotiert und anschließend, wie in Tabelle 2.12 gezeigt, weiter mit dem Präinkubationspuffer verdünnt. Des Weiteren wurden nach 4.9.4 verfahren. Anhand einer Kalibrierreihe wurden die Konzentrationen rechnerisch ermittelt. Die mittlere Wiederfindung betrug 105,4%. Der Einfluss des verwendeten Präinkubationspuffers ist somit minimal.

Tabelle 2.12: Linearitätsprüfung des ELISA.

Verdünnungs- faktor	Erwartete Konzentration [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	berechnete Konzentration [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Wiederfindung [%]
10	0,50	0,56	111,1% $\pm$ 3,0%
16	0,31	0,31	98,3% $\pm$ 5,8%
20	0,25	0,25	99,3% $\pm$ 1,6%
50	0,10	0,11	112,8% $\pm$ 3,4%

#### 2.4.8.4 Wiederfindung und Vergleich zur HPLC

Da der ELISA auf Rohextrakte der Kulturüberstände angewendet wurde, wurde der Extrakt des Kulturmediums ohne Pilz als Probenmatrix hergestellt, in Acetonitril gelöst und diese für die Wiederfindungsversuche verwendet. Diese Probenmatrix wurde Striatal B in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und analysiert, um die Wiederfindungen, die Nachweisgrenze und die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung zu überprüfen. Die Untersuchungen wurden sowohl mittels ELISA als auch mittels HPLC-DAD (Tabelle 4.16) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.13 dargestellt. Die Bestimmungsgrenze betrug für den ELISA  $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$  und für die HPLC-DAD-Methode  $0,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Die mit beiden Methoden analysierten Konzentrationen ergaben eine gute Korrelation mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9942$  (Abbildung 2.56).

Tabelle 2.13: Aufstockung und Wiederfindung.

aufgestockte Konzentration [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	ELISA (n=3)		HPLC-DAD (n=2)	
	ermittelt [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Wiederfindung [%]	ermittelt [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Wiederfindung [%]
10,010	a. L.	-	$10,50 \pm 0,05$	104,8%
5,005	a. L.	-	$5,26 \pm 0,10$	105,1%
2,002	$1,949 \pm 0,219$	97,3%	$2,03 \pm 0,08$	101,5%
1,001	$1,048 \pm 0,199$	104,7%	$0,96 \pm 0,02$	95,8%
0,501	$0,630 \pm 0,291$	125,9%	$0,50 \pm 0,00$	99,6%
0,400	$0,478 \pm 0,062$	119,3%	$0,44 \pm 0,02$	110,2%
0,200	$0,252 \pm 0,026$	113,0%	n. n.	-
0,020	$0,021 \pm 0,001$	102,8%	n. n.	-
0,001	n. n.	-	n. n.	-

a.L.: nachweisbar, aber nicht quantifizierbar, da außerhalb des Linearbereiches.

n.n.: nicht nachweisbar.

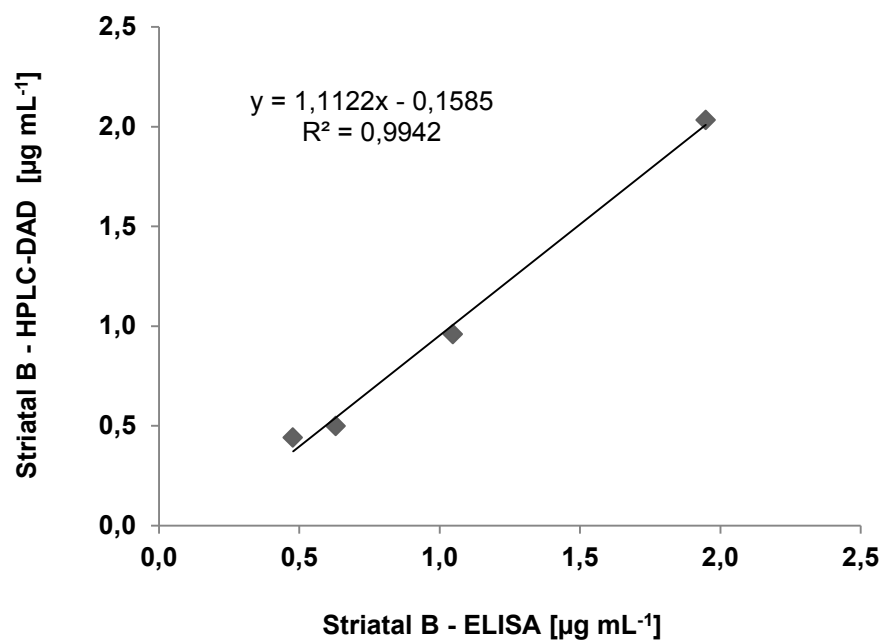


Abbildung 2.56: Korrelation der ermittelten Striatal B-Konzentrationen in der Probenmatrix mittels ELISA (x-Achse) und HPLC-DAD (y-Achse).  $R^2 = 0,9942$ .

#### 2.4.8.5 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit des ELISA zu überprüfen, wurden Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten berechnet (Tabelle 2.14). Zur Ermittlung der Intraassay-Variationskoeffizienten wurden sechs verschiedene Striatal B-Konzentrationen in Dreifachbestimmung auf einer Mikrotiterplatte bestimmt. Mit der Bestimmung der Reproduzierbarkeit von Platte zu Platte (Interassay-Variationskoeffizient) wurden im Vergleich zum Intraassay-Variationskoeffizient größere Schwankungen der Messergebnisse bei wiederholten Versuchen (n=8) ermittelt. Der aus der Kalibrierreihe berechnete  $IC_{50}$ -Wert von Striatal B betrug  $36,0 \text{ ng mL}^{-1}$  mit einem Interassay-Variationskoeffizient von 13,2% (n=5).

Tabelle 2.14: Intra- und Interassay-Reproduzierbarkeit.

Konzentration [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Intraassay (n=3) Variationskoeffizient [%]	Interassay (n=8) Variationskoeffizient [%]
0,63	2,7	16,3
0,32	3,9	14,8
0,16	1,7	16,3
0,08	2,4	8,3
0,04	4,5	10,4
0,0006	5,1	3,6

#### 2.4.8.6 Analyse von Kulturüberständen und Kulturextrakten

Die Kulturüberstände aus den Submerskulturen von *H. erinaceus* wurden mittels indirektem kompetitivem ELISA analysiert. Dieser Versuch fand unter Zusatz von 5% DMSO statt (2.4.8.1). Je niedriger der % B/B<sub>0</sub>-Wert ist, desto mehr mit Striatal B konkurrierende Moleküle liegen in den Kulturüberständen vor. Das Kulturmedium ohne Pilz führte zu einem positiven Signal durch Medienbestandteile. Die Kulturüberstände von Tag 1 bis Tag 9 wurden alle als positiv bewertet. Ein minimaler % B/B<sub>0</sub>-Wert wurde an Kulturtag 4 erreicht (Abbildung 2.57).

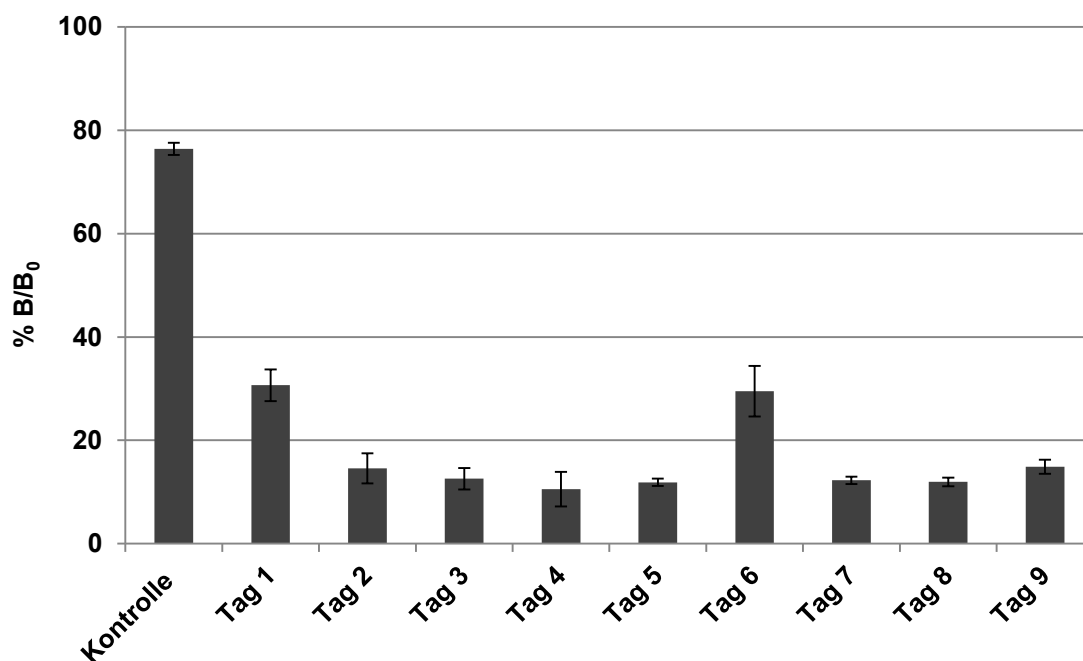


Abbildung 2.57: Screening von Kulturüberständen von Submerskulturen von *H. erinaceus* im indirekten kompetitiven ELISA. Kontrolle: Kulturmedium ohne *H. erinaceus*; Tag 1 bis Tag 9: Kulturmedium mit *H. erinaceus*

Die Ethylacetatextrakte aus Submerskulturen von *H. erinaceus*, die zuvor mittels HPLC-DAD und HPTLC analysiert wurden (2.2.2.3), wurden ebenfalls mit dem indirekten kompetitiven ELISA analysiert (Abbildung 2.58). Dieser Versuch fand unter Zusatz von 5% ACN statt (2.4.8.1), da die Proben für die HPLC und HPTLC-

Analyse in ACN gelöst waren. Das mit Ethylacetat extrahierte Kulturmedium ohne Pilz zeigte hier im Vergleich zu Abbildung 2.57 keinen signifikanten Matrixeffekt. Die Extrakte aus Kulturüberständen von Tag 1 bis Tag 9 wurden alle als positiv bewertet. Es lag schon ab dem ersten Kulturtag eine starke Konkurrenz durch die von Pilz produzierten Substanzen vor. Für die Kulturtage 3 und 7 wurden besonders niedrige %B/B<sub>0</sub>-Werte registriert. Der Einsatz von Rohextrakten aus Submerskulturen stellte sich wegen des geringeren Matrixeffektes als aussagekräftiger heraus.

Aus der Kalibriergerade für Striatal B wurde ein Verlauf der Produktbildung (basierend auf Abbildung 2.58) dargestellt (Abbildung 2.59).

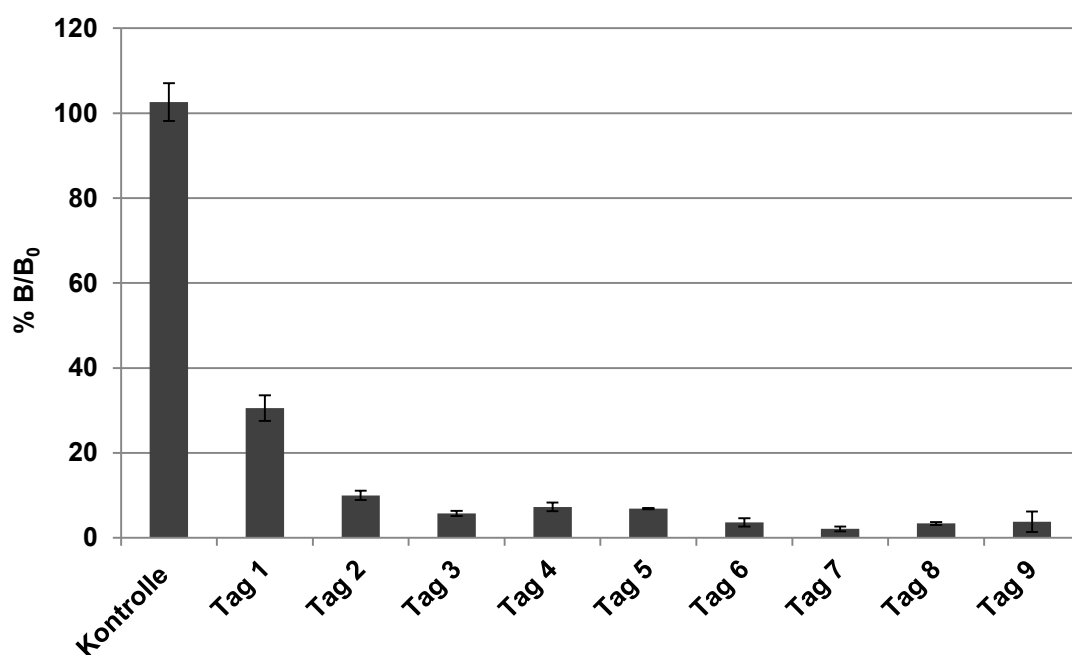


Abbildung 2.58: Screening von extrahierten Kulturüberständen aus Submerskulturen von *H. erinaceus* im indirekten kompetitiven ELISA. Kontrolle: Kulturmedium ohne *H. erinaceus*; Tag 1 bis Tag 9: Kulturmedium mit *H. erinaceus*.

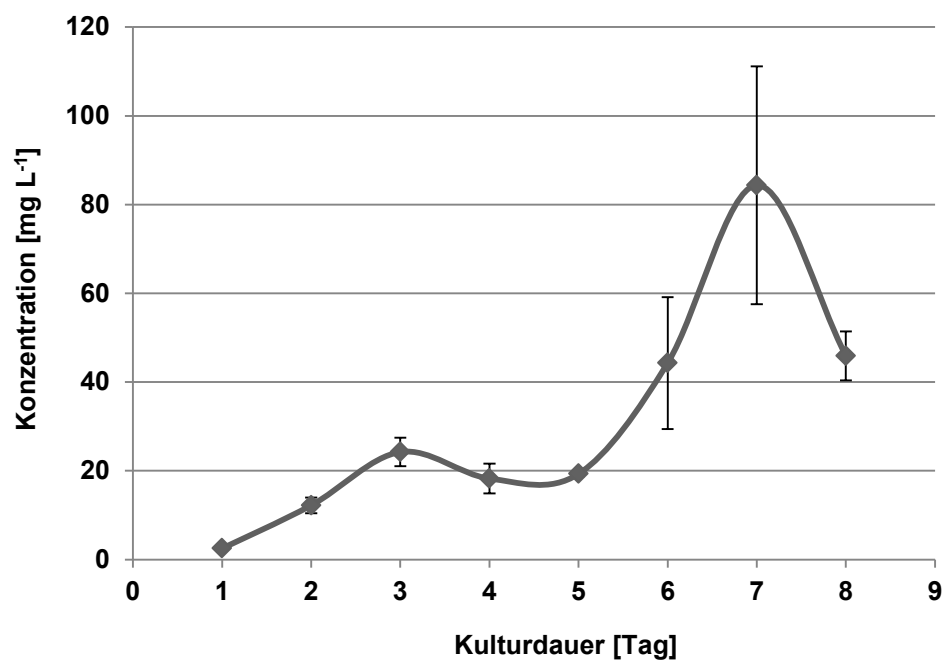


Abbildung 2.59: Analyse der Produktbildung mittels ELISA (berechnet aus Kalibrierung für Striatum B).



#### 2.4.8.7 Analyse eines Rohextraktes aus Fruchtkörpern von *H. erinaceus*

Der Ethylacetat-Rohextrakt des Fruchtkörpers von *H. erinaceus* wurde mittels ELISA (unter Zusatz von 5% ACN) analysiert. Unabhängig von der eingesetzten Rohextrakt-Konzentration betrugen die beobachteten %B/B<sub>0</sub>-Werte ca. 100% (Abbildung 2.60).

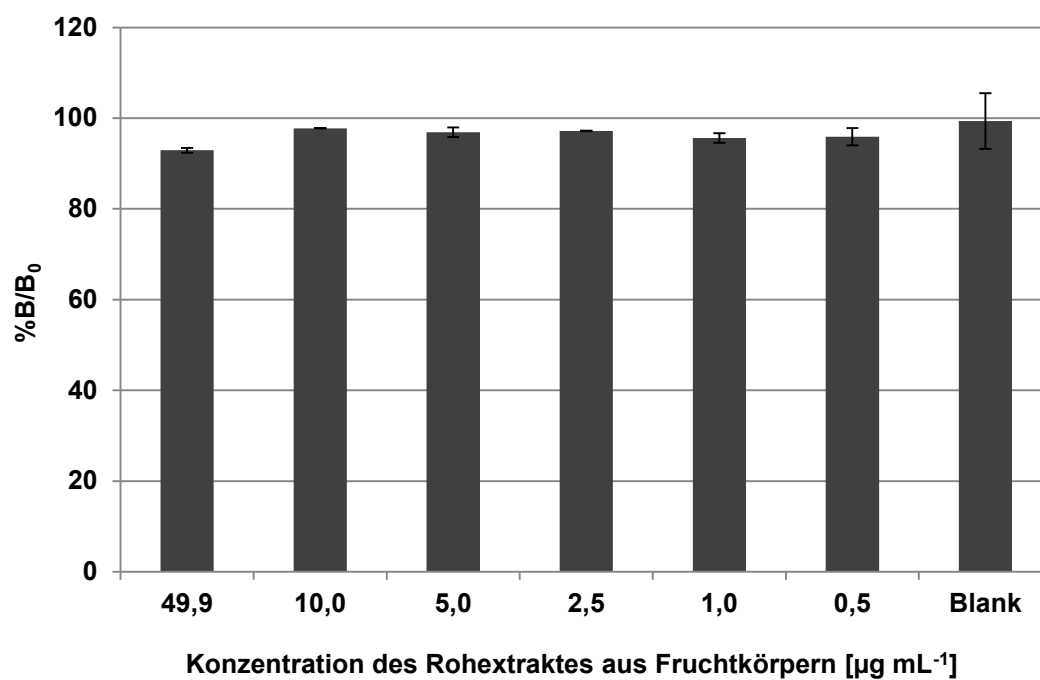


Abbildung 2.60: %B/B<sub>0</sub>-Werte der Rohextrakte aus Fruchtkörpern von *H. erinaceus* in Abhängigkeit von der Konzentration im indirekten kompetitiven ELISA. Blank: ohne Fruchtkörper-Rohextrakt.

### 2.4.9 Zusammenfassung des ELISA

Ein indirekter kompetitiver ELISA zum Nachweis von Cyathan-Diterpenoiden wurde etabliert. Die optimalen Parameter sind in Tabelle 2.10 zusammengefasst. Um die Löslichkeit der Striatale, Striatine und Erinacine im Präinkubationspuffer (PBST) zu erhöhen, wurde die Toleranz des Assays gegenüber den Lösungsmitteln DMSO, Acetonitril und Methanol im kompetitiven ELISA untersucht. Ein Zusatz von 5% der getesteten Lösungsmittel erwies sich als tolerierbar. Die Kreuzreaktivitäten von den mit Striatal B strukturverwandten Substanzen Striatal A, C und D, Striatin A und B, und Erinacin C und P wurden bestimmt. Dabei wies Striatin B die höchste Kreuzreaktivität gegenüber Striatal B auf. Der etablierte indirekte kompetitive ELISA wurde auf Kulturüberstände bzw. Rohextrakte aus Kulturüberständen der Submerskulturen angewendet. Der Einsatz des ELISA für die Rohextrakte aus Submerskulturen stellte sich wegen des geringeren Matrixeffektes als aussagekräftiger heraus. Beim Rohextrakt aus Fruchtkörpern von *H. erinaceus* wurde keine signifikante Konkurrenz gegenüber Striatal B beobachtet.

## 2.5 Molekularphylogenetische Charakterisierung von *H. erinaceus*

### *Fruchtkörper von H. erinaceus*

Zur molekularphylogenetischen Charakterisierung der Fruchtkörper von *H. erinaceus* wurde nach White *et al.* (1990) aus genomischer DNA (4.10) mit den Primern ITS4 und ITS5 ein ca. 600 bp großes Fragment amplifiziert, das für die 5,8S ribosomale Untereinheit inklusive der flankierenden ITS-Bereiche ITS1 und ITS2 (Internal Transcribed Spacer Region) codiert (Abbildung 2.61).

```
GTATGCGTGCTGTCCGCTGATTCGAGGTCAGTTGAGATGAAAGTTGTCCGAAGACGGTTAGA
AGCAGACCAACGCAAGGCTACCCGCGGCGTAGATAATTATCACACCAAGGGCAAACCCTAC
AAAAGGGATCCACTCATGCATTCAAGAGGAGCCGACTTCCCGAGGGAGCACCGGCAAGACC
TCCAAGTCCAAGCCCAGCCCTCTCATAACAAGAGGATTGAGTTGAGAATTTACGACACTCG
AACAGGCGTGCCCCCTCGGAATACCAAGGGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCA
CTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCA
AGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTATAAGATGCGTTTATAGCATTATGACATTCTGTTACATACA
TAAGAGTTTATGAAAAACGCAAGCCCATCGACCGCAAAGCCGACGGACCCACGCAAGGGTG
CACAGGTGTAAGATGGATGAGATTGGAGCGTGCACATGCCTGGGTTTCAGGCCAGCAACAA
CTCCTTTCAAATTCATTAATGATCCTTCCGCAGGTTTACCCTACGGAGAGAAGATTTATTATT
GATTTTGAGAAGGTTGTTGTTGGCTGGCCTGAAACCGGGGTGTGGACGCTCCAATCTCTTCT
CTCATACTCGTGAGCCCTGCGTGCGTGGTTCGTTTGTGCTGTTGCGAGGGCTGGGCTTTTTTT
TAAACCTAACTCATGTGACTGAAAGTGAATGTGCTTTAGACGATCTTAGAATACTTTTACAAC
GTAGCTTTGCGTCTCACCTGTCAAAAAACGACCGCTGAAGCACGCAGTAAAGATGCAATGCG
TAATGTTGTTGACCATCTTAATCTCTGCACCCCTCGACGTCCCGGGGGGCCGCTGCTATTTTCG
TGGAATCTACACGACTCCTGTTATCAAAGGCGGGCTCTGGACCTGGAGAGTCTGCGAGCTC
CTCGGCAGATGATCTAGTCCGACATAGATCTAATCTTAACGTGCCTCTATGTGAATAATACGC
AGAGACGCGAAAGTGCTGTTATGACAGTCGTTCACTGCTCATATCGG
```

Abbildung 2.61: DNA-Sequenz der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit flankierendem ITS-Bereich von *H. erinaceus* Fruchtkörpern.

Ein Datenbankvergleich (NCBI BLAST®) ergab eine Homologie von 99% zu verschiedenen *H. erinaceus*-Stämmen (Tabelle 2.15).

Tabelle 2.15: Auswahl von Homologien der DNA-Sequenz der 5,8S Untereinheit mit flankierendem ITS-Bereich der Fruchtkörper zu verschiedenen Stämmen von *H. erinaceus* (Park *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2002; Brock *et al.*, 2009).

GenBank Zugriffsnummer	Organismus	Geographische Herkunft	Homologie	E- Wert
AY534583	<i>H. erinaceus</i> (CBS 485.95)	USA	99%	0,0
AY534600	<i>H. erinaceum</i> * (KUMC 1022)	China	99%	0,0
AY534601	<i>H. erinaceum</i> * (KUMC 1023)	Korea	99%	0,0
AY534597	<i>H. erinaceum</i> * (KUMC Y-2)	Japan	99%	0,0
AY534585	<i>H. erinaceum</i> * (NFCF F01)	Malaysia	99%	0,0
AF397469	<i>H. erinaceum</i> * (HT <sub>DB</sub> )	China	99%	0,0
EU784264	<i>H. erinaceus</i> (KM 61209)	UK	99%	0,0
EU784265	<i>H. erinaceus</i> (KM 62494)	UK	99%	0,0

\*: *H. erinaceum* ist eine falsche Schreibweise für *H. erinaceus*.

### ***H. erinaceus* (FU70034)**

Der für die Submerskulturen verwendete Stamm *H. erinaceus* (FU70034) wurde von IMD zu Beginn der Arbeit molekularphylogenetisch charakterisiert (Abbildung 2.62).

```
TCATTAATGATTTGAAAGGAGTTGTTGCTGGCCTGAAACCCAGGCATGTGCATGCTCCAATCT
CATCCATCTTACACCTGTGCACCCCTTGCGTGGGTCCGTCCGCTTTGCGGTGCATGGGCTTGC
GTTTTTCATAAACTCTTACGCACGCAACGAGAATGTCATAATGCTATAAACGCATCTTATACAA
CTTTCACAACGGATCTCTTGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGATTCCGA
GGGGCACGCCTGTCGAGTGTCTGAAATCTCAACTCAATCCTCTTGATGAGAGGGTTGGGC
TTGGACTTGGAGGCTCGCCGTGCTCTCGGAAGTCGGTCTCTTGAATCGCATCGAT
```

Abbildung 2.62: DNA-Teilsequenz der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit flankierendem ITS-Bereich von *H. erinaceus* (FU70034) Submerskultur (IMD).

Datenbankvergleiche zeigten für diesen Stamm eine Homologie von 94 ~ 95% zu verschiedenen *H. erinaceus*-Stämmen (Tabelle 2.16).

Tabelle 2.16: Auswahl von Homologien der DNA-Sequenz der 5,8S Untereinheit mit flankierendem ITS-Bereich vom Stamm FU70034 zu verschiedenen Stämmen von *H. erinaceus* (Park *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2002; Brock *et al.*, 2009).

GenBank Zugriffsnummer	Organismus	Geographische Herkunft	Homologie	E- Wert
AY534600	<i>H. erinaceum</i> * (KUMC 1022)	China	95%	0,0
AY534601	<i>H. erinaceum</i> * (KUMC 1023)	Korea	95%	0,0
AY534597	<i>H. erinaceum</i> * (KUMC Y-2)	Japan	95%	0,0
AY534585	<i>H. erinaceum</i> * (NFCF F01)	Malaysia	95%	0,0
AY534583	<i>H. erinaceus</i> (CBS 485.95)	USA	94%	0,0
EU784264	<i>H. erinaceus</i> (K(M)61209)	UK	95%	0,0
EU784265	<i>H. erinaceus</i> (K(M)62494)	UK	94%	0,0
AF397469	<i>H. erinaceum</i> * (HT <sub>DB</sub> )	China	95%	0,0

\*: *H. erinaceum* ist eine falsche Schreibweise für *H. erinaceus*.



### 3 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit den von Basidiomyceten produzierten Cyathan-Diterpenoiden (Striatale, Striatine und Erinacine). Cyathan-Diterpenoide sind Naturstoffe, die aus diversen Pilzarten isoliert werden können. Alle Cyathan-Diterpenoide verfügen über ein charakteristisches Cyathan-Grundgerüst, das aus je einem Fünf-, Sechs- und Siebenring besteht (Abbildung 3.1).

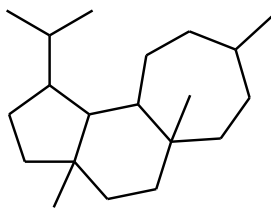


Abbildung 3.1: Cyathan-Grundgerüst (Enquist und Stoltz, 2009).

Die ersten Cyathan-Diterpenoide, die als Cyathin A<sub>3</sub> und Allocyathin B<sub>3</sub> (Abbildung 3.2) bezeichnet wurden, wurden von Ayer und Mitarbeitern Anfang der 1970er Jahre aus einem Extrakt der Submerskultur des Vogelnestpilzes *Cyathus helenae* (H. J. Brodie) (Nidulariaceae) isoliert und charakterisiert. Die beiden Cyathane wirkten aktiv gegen Actinomyceten, Bakterien (sowohl gram-positive als auch gram-negative) und gegen einige Pilze, einschließlich Dermatophyten (Allbutt *et al.*, 1971; Ayer und Taube, 1972). Danach wurden auch zahlreiche andere Cyathan-Diterpenoide aus verschiedenen natürlichen Quellen entdeckt. Die wichtigsten Vertreter sind Allocyathine, Erinacine, Sarcodonine, Scabronine, Striatale, Cyanthiwigine und Cyafrine.

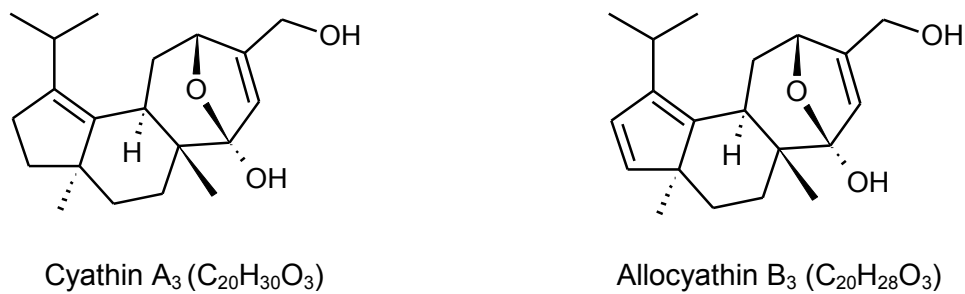


Abbildung 3.2: Die ersten Cyathan-Diterpenoide: Cyathin A<sub>3</sub> und Allocyathin B<sub>3</sub> (Allbutt *et al.*, 1971).

Im Jahr 1977 wurden Striatin A, B und C aus Submerskulturen von *C. striatus* (Huds. ex Pers.) Willd. (Nidulariaceae) isoliert (Anke und Oberwinkler, 1977). Die Strukturen wurden danach von Hecht mittels NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Bei weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Striatine erst bei der Extraktion mit Methanol aus den eigentlichen Pilzmetaboliten, den Striatalen, entstehen. Bei den Striatinen bzw. Striatalen handelt es sich um Diterpene mit einem Cyathan-Grundgerüst, das glykosidisch und über eine C-C-Verknüpfung mit Xylose verbunden ist. In Anwesenheit von Wasser und Säure gehen die Striatine in Striatale über (Abbildung 3.3) (Hecht *et al.*, 1978; Anke *et al.*, 2002). Striatale und Striatine besitzen antibakterielle, fungizide und cytotoxische Eigenschaften und sind hoch aktiv gegen Leishmaniose (Allbutt *et al.*, 1971; Anke und Oberwinkler, 1977; Inchausti *et al.*, 1997; Anke *et al.*, 2002). Die Untersuchungen des Kulturextraktes von *C. striatus* zeigten eine signifikante positive Regulierung der Nuclear Factor-kappa B-Funktion (NF-κB-Funktion), was auf die Möglichkeit hindeutet, es als Brustkrebstherapeutikum nutzen zu können (Petrova *et al.*, 2007).



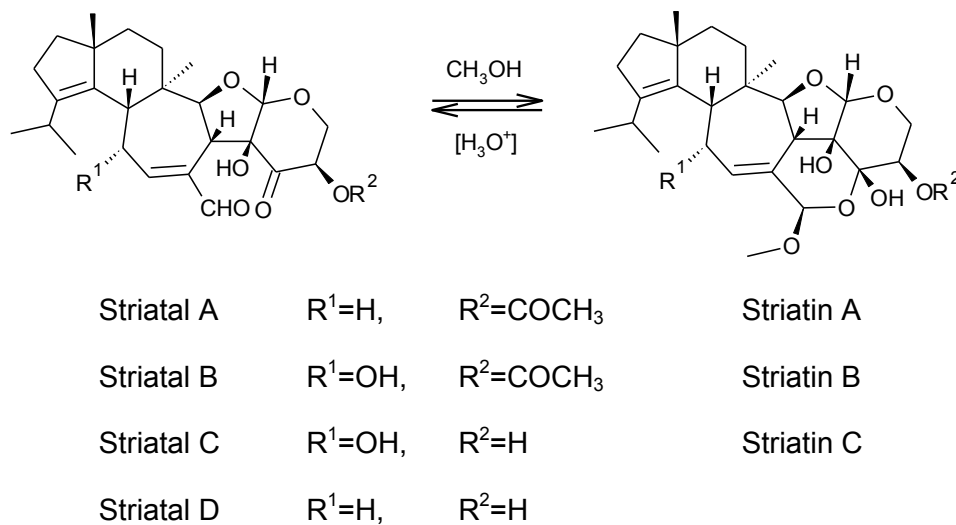


Abbildung 3.3: Konversion von Striatolen zu Striatinen (Anke *et al.*, 2002).

Ayer und Lee (1979) isolierten weitere Cyathine, Allocyathine und Cyathatriole aus einer Submerskultur von *Cyathus earlei* (Lloyd) (Nidulariaceae). Daraufhin wurde der Biosyntheseweg von 11-O-acetylcyathatriol untersucht (Ayer *et al.*, 1979).

*Sarcodon scabrosus* (Fr.) Karst. gehört zu der Familie Thelephoraceae und ist ebenfalls als Produzent von Cyathan-Diterpenoiden bekannt. Shibata *et al.* (1989) isolierten acht neue Cyathane aus seinen Fruchtkörpern. Sie klärten ihre Strukturen auf und benannten sie als Sarcodonine A – H. Die Sarcodonine A und G zeigten eine signifikante Förderung des Nervenwachstums (Shi *et al.*, 2011). Ein weiteres Cyathan, Sarcodonin I, wurde von Ma und Liu (2005) isoliert. Ohta *et al.* (1998) und Kita *et al.* (1998) berichteten von den Scabroninen A bis F. Die Verbindungen besitzen ebenfalls ein Cyathan-Grundgerüst und können die Synthese des Nerve Growth Factors (NGF) stimulieren. Dies macht sie besonders interessant für die Medizin, denn sie könnten als potentielle Heilmittel für degenerative Nervenerkrankungen wie Alzheimer dienen und die Regeneration peripherer Nerven anregen. Einige Jahre später wurden drei weitere Cyathanderivate, nämlich die Scabronine G, H (Ma *et al.*, 2004) und J (Ma und Ruan, 2008) in derselben Pilzart entdeckt. Scabronin M aus *S. scabrosus* ist erst seit 2012 bekannt (Liu *et al.*, 2012a). Alle bislang bekannten Cyathane aus *S. scabrosus* wurden lediglich aus den Fruchtkörpern isoliert, weil es sich bei dieser

Pilzart um eine obligate Mycorrhizagattung handelt, welche sich nicht gut submers kultivieren lässt.

Im Gegensatz dazu wurde aus Submerskulturen von *H. erinaceus* (Bull. Pers.) (Hericiaceae) eine Reihe von Erinacinen, wie z. B. Erinacin A, B und C (Kawagishi *et al.*, 1994), Erinacin D (Kawagishi *et al.*, 1996b), Erinacin E, F und G (Kawagishi *et al.*, 1996a), Erinacin H und I (Lee *et al.*, 2000), Erinacin J und K (Kawagishi *et al.*, 2006), Erinacin P (Kenmoku *et al.*, 2000), Erinacin Q (Kenmoku *et al.*, 2002) und Erinacin R (Ma *et al.*, 2008b) isoliert (Abbildung 3.4). Die Erinacine können wie die Scabronine den sogenannten NGF stimulieren. Dabei wies Erinacin C die stärkste induzierende Wirkung auf die NGF-Synthese auf (Kawagishi und Zhuang, 2008). Von Erinacin E ist außerdem bekannt, dass es als  $\kappa$ -Opiat-Rezeptor-Agonist wirkt und somit ein mögliches Mittel zur Schmerzlinderung darstellt (Saito *et al.*, 1998). Der Acetonextrakt aus den Fruchtkörpern von *H. erinaceus* enthielt verschiedene Hericenone, welche nicht zu den Cyathan-Diterpenoiden gehören. Sie verfügen ebenfalls über eine erwähnenswerte Aktivität zur Stimulierung der NGF-Synthese bzw. zum Schutz vor dem Zelltod von Nervenzellen *in vitro* und *in vivo* (Kawagishi und Zhuang, 2008). Mizuno *et al.* (1992) berichteten über Antitumor-Aktivität der aus Fruchtkörpern isolierten Polysaccharide. Die Aufnahme gepulverter Fruchtkörper von *H. erinaceus* reduzierte Depression und Angstgefühl (Nagano *et al.*, 2010). Ein Wasserextrakt aus Fruchtkörpern von *H. erinaceus* zeigte antikanzerogene Aktivität (Yim *et al.*, 2007).

*Phellodon niger* (Fr.) Karst. (Thelephoraceae) ist ebenfalls ein Produzent von Cyathan-Diterpenoiden. Aus seinen Fruchtkörpern wurden bisher sechs neue Cyathan-Diterpenoide isoliert, nämlich Nigernin A, B, C, D, E und F (Fang *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2011).

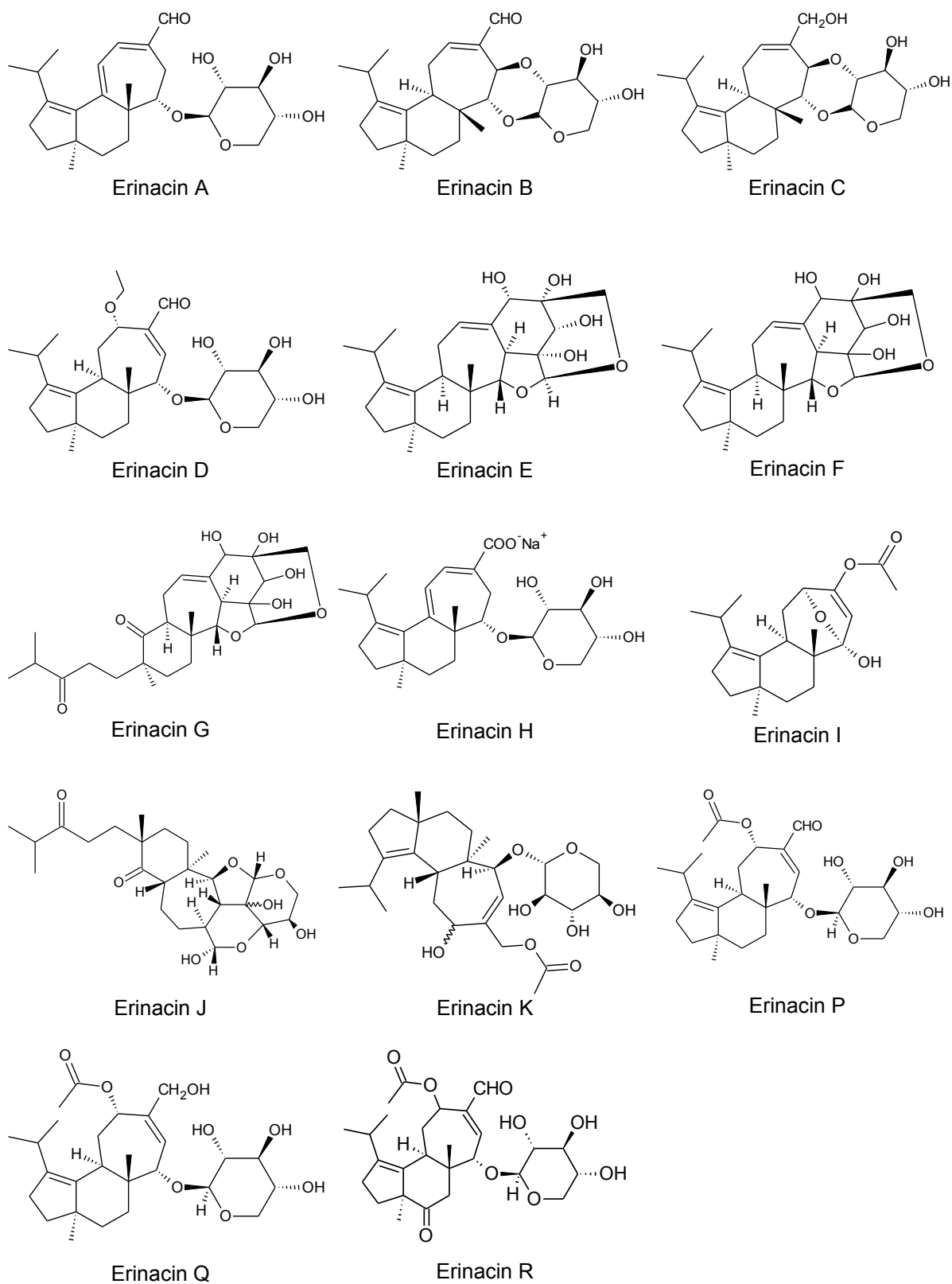


Abbildung 3.4: Bisher charakterisierte Erinacine aus *H. erinaceus*, modifiziert nach den im Text genannten Literaturquellen.

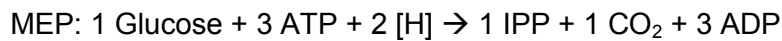
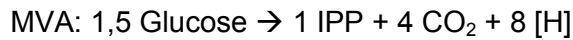
Wegen der vielfältigen Funktionen und interessanten Bioaktivitäten der Cyathan-Diterpenoide wurden bereits zahlreiche Untersuchungen zur Synthese dieser Naturstoffe, sowohl rein chemisch (Enquist und Stoltz, 2009; Enquist *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2009; Wender *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2007; Watanabe und Nakada, 2008b; Piers *et al.*, 2000), als auch biotechnologisch (Dixon *et al.*, 2011; Rabe, 1989; Arnoldi, 1990; Böker, 1990; Gehrig, 1996; Ehlers, 1998) durchgeführt. Bisherige Untersuchungen bezogen sich vorwiegend auf die Isolierung und Entdeckung neuer Cyathan-Diterpenoide aus Basidiomyceten. Allerdings wurde nur selten die Optimierung der Produktbildung untersucht. Die am häufigsten beschriebene Analysemethode ist die HPLC. Im Folgenden wird die biotechnologische Gewinnung der Cyathan-Diterpenoide im Zusammenhang mit verschiedenen Analyse- und Nachweismethoden diskutiert.

## **3.1 Biosyntheseweg**

### **3.1.1 Natürliche Terpenoide**

Die Terpene stellen eine Familie von Naturstoffen dar, die eine große strukturelle Vielfalt aufzeigt. Alle Terpene lassen sich formal von Isopren-Einheiten  $(C_5H_8)_n$  ableiten. Statt Isopren wird in der Biosynthese Isopentenylpyrophosphat (IPP) verwendet, das mit dessen Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) zur universellen Terpenvorstufe Geranylpyrophosphat (GPP,  $C_{10}$ ) gekoppelt wird. Der für die Biosynthese der Terpene benötigte Baustein IPP kann auf zwei Wegen gebildet werden: Zum einen über den so genannten Mevalonsäure-Weg (MVA), bei dem IPP aus Acetyl-Coenzym A entsteht, zum anderen über den Mevalonsäure unabhängigen Weg (non-MVA), der erst in den 1990er Jahren in Bakterien, Algen und Pflanzen entdeckt wurde. Dieser Weg beginnt mit Pyruvat und Glyceraldehyd-3-phosphat und wird nach dem spezifischen Intermediat als 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Weg (DOXP) oder Methylerythritol-4-phosphat-Weg (MEP) bezeichnet (Rohmer, 1999; Lichtenthaler, 1999).

Steinbüchel (2003) fasste Unterschiede zwischen dem MVA- und MEP-Weg aus stöchiometrischer Sicht wie folgt zusammen:



Der MVA-Weg ist demnach aus energetischer Sicht wesentlich effizienter als der MEP-Weg.

In der folgenden Tabelle 3.1 sind einige Beispiele für den Biosyntheseweg der Terpene von verschiedenen Mikroorganismen (Pilze, Pflanzen und Bakterien) dargestellt. Gleiche Terpenoide können durch verschiedene Mikroorganismen über unterschiedliche Wege biosynthetisiert werden (Eisenreich *et al.*, 1998; Hirai *et al.*, 2000; Bömke und Tudzynski, 2009).

Tabelle 3.1: Biosyntheseweg der Terpenoide von verschiedenen Pilzen und Pflanzen.

Stamm	Terpenoide	Biosyntheseweg
<i>Cyathus striatus</i> (Basidiomycet)	Striatale	MVA (Anke <i>et al.</i> , 2002)
<i>Cyathus earlei</i> Lloyd (Basidiomycet)	Cyathine	MVA (Ayer <i>et al.</i> , 1979)
<i>Botrytis cinerea</i> (Ascomycet)	Abszissinsäure	MVA (Hirai <i>et al.</i> , 2000)
<i>Liriodendron tulipifera</i> (Pflanze)	Abszissinsäure, β-Carotin	MEP (Hirai <i>et al.</i> , 2000)
<i>Capsicum annuum</i> (L.) (Pflanze)	Phytoen, β-Carotin	MEP (Fellermeier <i>et al.</i> , 2001)
<i>Fusarium fujikuroi</i> (Ascomycet)	Gibberelline	MVA (Bömke und Tudzynski, 2009)
<i>Fragaria x ananassa</i> Duch. (Pflanze)	(S)-Linalool, trans-(S)-Nerolidol	MVA (Hampel <i>et al.</i> , 2006)
<i>Fragaria vesca</i> (Pflanze)	(-)-α-Pinen	MVA (Hampel <i>et al.</i> , 2006)
<i>Rhodotorula glutinis</i> (Hefe)	Ergosterol, Ubichinon	MVA (Disch, 1998)
<i>Taxus chinensis</i> (Pilg.) Rehd.(Pflanze)	Taxol	MEP (Eisenreich <i>et al.</i> , 1996)
<i>Streptomyces niveus</i> (Smith <i>et al.</i> ) (Actinomycet)	Novobiocin	MEP (Orihara <i>et al.</i> , 1998)

Mittels isotoopenmarkierter Glucose wurde für *C. striatus* nachgewiesen, dass die Biosynthese der Cyathan-Diterpenoide über den Mevalonat-Weg verläuft (Rabe, 1989; Anke *et al.*, 2002). Der Terpenteil der Striatale wird über den Mevalonatweg synthetisiert. Die Bildung des Ringsystems des Cyathan-Grundgerüsts erfolgt durch einen Cyclisierungsmechanismus des Geranylgeranyl-Pyrophosphats (GGPP) über den von Ayer *et al.* (1979) beschriebenen Weg. Die Xylose kommt sowohl aus dem Pentosephosphatzzyklus (etwa zu 30%), als auch aus der Decarboxylierung der Glucose am C-6 (etwa zu 70%). In Abbildung 3.5 sind die Biosynthesewege der Bausteine der Striatale zusammengefasst (Rabe, 1989).

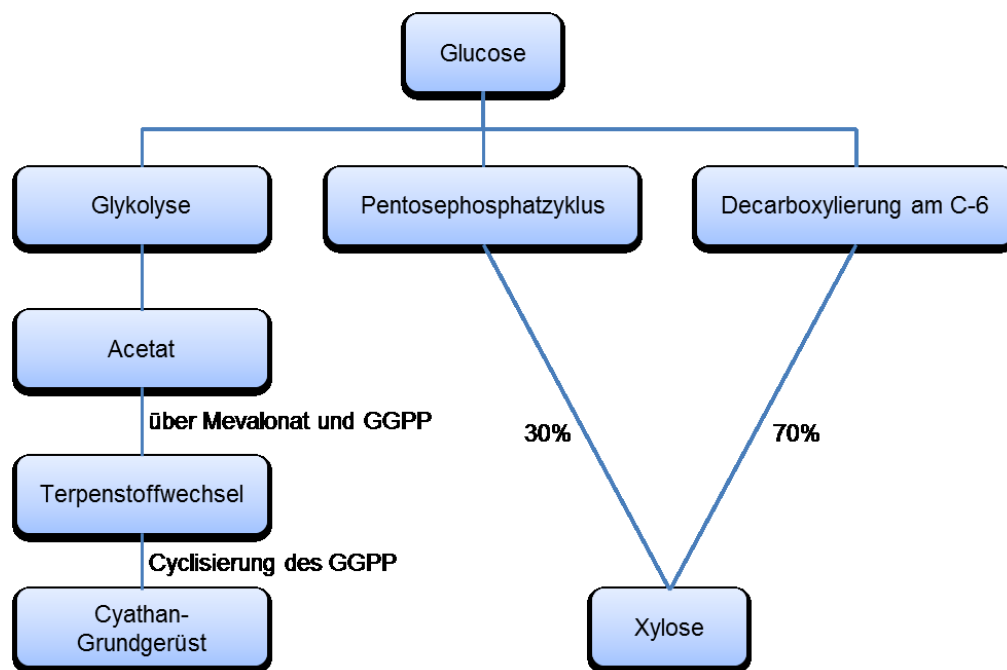


Abbildung 3.5: Beteiligte Stoffwechselwege zur Bereitstellung der Bausteine für die Striatalsynthese, modifiziert nach Rabe (1989). GGPP: Geranylgeranyl-Pyrophosphat.

Im Vergleich zu der großen Anzahl von identifizierten Terpensynthasen in Pflanzen wurden bisher sehr wenige Terpensynthasen aus Basidiomyceten identifiziert und funktionell charakterisiert. Agger *et al.* (2009) berichteten von sechs Sesquiterpensynthasen (Cop1 – Cop6) und zwei terpenoxidierenden Cytochrom P450 Monooxygenasen (Cox1 und Cox2) aus *Coprinus cinereus*. Mit der heterologen Genexpression wurde gezeigt, dass die Sesquiterpensynthasen

die Bildung verschiedener Sesquiterpene als Hauptprodukte katalysierten. Ebenfalls beschrieben Engels *et al.* (2011) eine Protoilluden-Synthase aus *Amillaria gallica*, die lediglich die Cyclisierungsreaktion von Farnesyldiphosphat zu 6-Protoilluden katalysierte. Allerdings wurde bisher kein Enzym, wie z. B. eine Cyathan-Synthase, beschrieben, welches die Cyclisierungs- und Umlagerungsschritte der Terpenvorstufe GGPP zu Cyathan-Diterpenoiden katalysiert.

### 3.1.2 Biosynthetische Intermediate der Cyathan-Diterpenoide

Erinacin P, das auch als „Herical“ bezeichnet wird, wurde mittels präparativer HPLC aus der Submerskultur von *H. erinaceus* am Kulturtag 4 isoliert (2.2.2.1, Tabelle 2.3). Mittels HPTLC und HPLC-DAD wurde festgestellt, dass die Konzentration an Erinacin P in den ersten drei bis vier Tagen anstieg. Danach wurde Erinacin P schnell abgebaut. Mit dem Abbau einhergehend war ein Anstieg der Konzentration von Erinacin C zu beobachten (Abbildung 2.16 und Abbildung 2.17). Erinacin P könnte daher eine Vorstufe von Erinacin C sein. Kenmoku *et al.* (2000) beschrieben, dass Erinacin P als ein ursprünglicher Metabolit der Familie der Cyathan-Xyloside (Cyathan-Grundgerüst gekoppelt mit einem Xylolederivat) betrachtet werden könnte. Daraus könnten die Erinacine A und B entstehen. Ein Vorversuch zur Untersuchung einer zeitabhängigen Bildung der Metabolite zeigte, dass Erinacin P deutlich früher als Erinacin A und B gebildet wurde (Daten wurden in der Publikation allerdings nicht präsentiert). Eine erfolgreiche Umsetzung von Erinacin P zu Erinacin A und B unter milden Bedingungen, wie z. B. bei Raumtemperatur, unterstützte ebenfalls die vorgeschlagene Biogenese.

Nach Zusatz von [1'-<sup>13</sup>C]-Erinacin P zu einer Submerskultur von *H. erinaceus* und <sup>13</sup>C-NMR-Analyse konnte festgestellt werden, dass die Menge an [1'-<sup>13</sup>C]-Erinacin C merklich anstieg. D. h. Erinacin P wurde weiter zu Erinacin C metabolisiert. Wenn [1'-<sup>13</sup>C]-Erinacin Q zu der Submerskultur hinzugefügt wurde, konnte eine Steigerung von [1'-<sup>13</sup>C]-Erinacin P mittels <sup>13</sup>C-NMR nachgewiesen werden. Erinacin Q und P dienen daher wahrscheinlich als allgemeine

biosynthetische Intermediate der Cyathan-Xyloside, wie zum Beispiel als Intermediate von Erinacin A, B, C und H in *H. erinaceus*, oder für Erinacin E, F und G in *H. romosum*, sowie für die Striatale in *Cyathus sp.* und *Gerronema fibula* (Kenmoku *et al.*, 2002). Ein von Kenmoku vorgeschlagener Biosyntheseweg ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

Anke *et al.* (2002) untersuchten den Biosyntheseweg von Striatal A und konnten anhand des Zusatzes von [1-<sup>13</sup>C]-D-Glucose und [2-<sup>13</sup>C]-D-Glucose zu einer Submerskultur von *C. striatus* nachweisen, dass Erinacin P ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Biosynthese von Striatal A spielte. Aus Erinacin P wird zunächst Striatal D gebildet. Striatal A resultiert aus der Acetylierung von Striatal D.



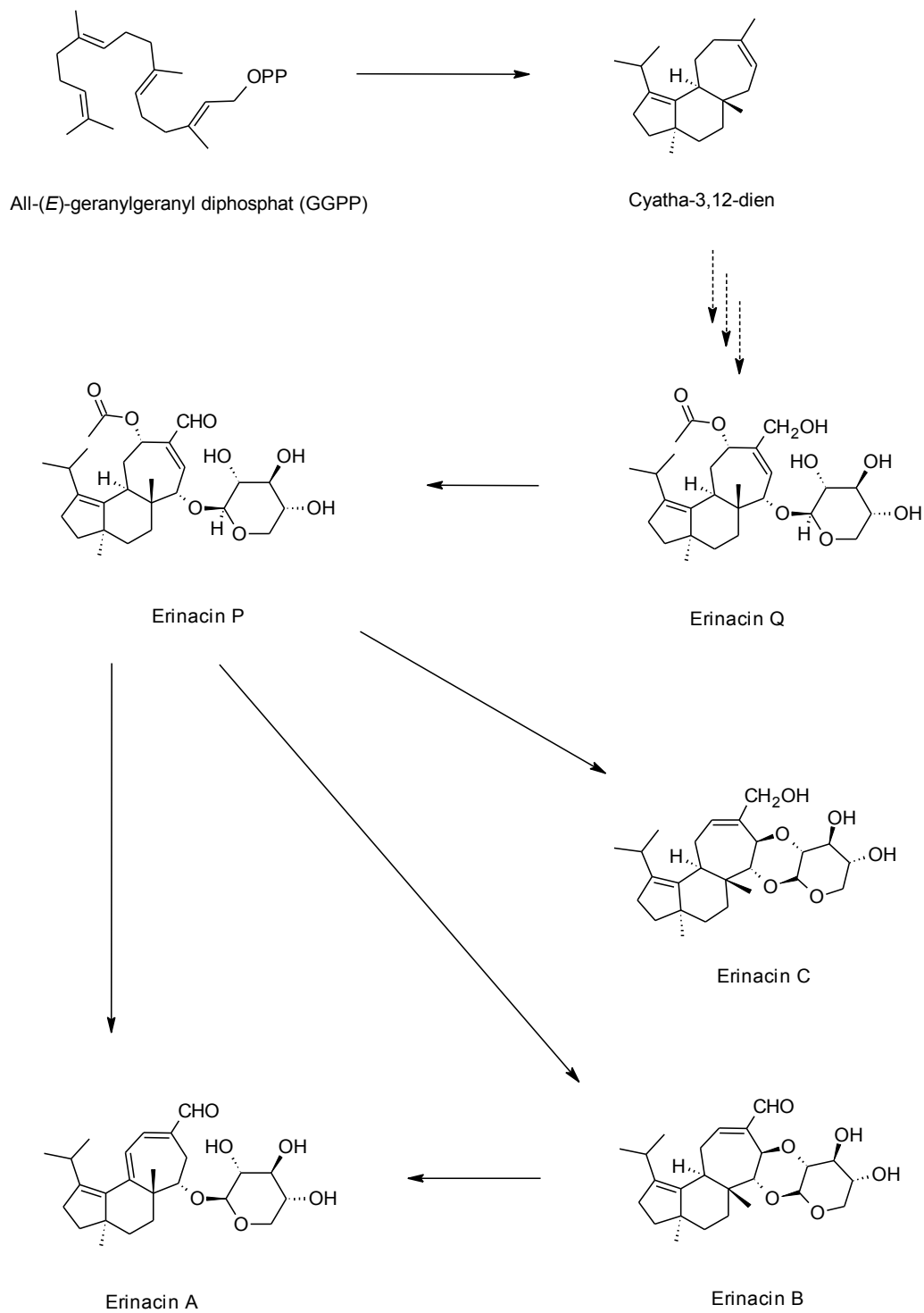


Abbildung 3.6: Biogenese der Erinacine, modifiziert nach Kenmoku *et al.*, 2000, Kenmoku *et al.*, 2001 und Kenmoku *et al.*, 2002.

## 3.2 Produktion von Cyathan-Diterpenoiden

### 3.2.1 Chemische Synthese

Als Naturstoffe zeigen die Cyathan-Diterpenoide vielfältige interessante biologische Aktivitäten. Aus medizinischer und pharmazeutischer Sicht spielt dabei die stimulierende Wirkung auf die NGF-Synthese eine besondere Rolle. Aus diesem Grund wurde schon seit der ersten Entdeckung der Cyathan-Diterpenoide aus Basidiomyceten versucht, diese Substanzenklasse chemisch zu synthetisieren. In der Literatur ist dazu eine Vielzahl unterschiedlicher Strategien beschrieben. Die schwierigste Aufgabe ist dabei die Synthese des Cyathan-Ringsystems, das aus je einem Fünf-, Sechs- und Siebenring besteht (Abbildung 3.1).

Wender *et al.* (2001) verwendeten (S)-(-)-Limonen als Ausgangsstoff. Nach 14 Schritten wurde das Cyathan-Grundgerüst mit einer Gesamtausbeute von 13% erhalten. Drège *et al.* (2005) begannen mit 2-Methylcyclopentanon und (S)-1-Phenylethylamin und erreichten ein Cyathan-Ringsystem erst nach 18 Schritten mit einer Gesamtausbeute von 1,4%.

Snider *et al.* (1998) berichteten über Allocyathin B<sub>2</sub> und Erinacin A als die ersten vollsynthetisierten Cyathan-Diterpenoide. Das Cyathan-Grundgerüst wurde in sieben Schritten mit einer Gesamtausbeute von 38% synthetisiert. Allocyathin B<sub>2</sub> wurde nach 17 Schritten mit einer Gesamtausbeute > 5% chemisch synthetisiert und Erinacin A nach 19 Schritten mit 1,0%iger Gesamtausbeute. Tori *et al.* (1998) versuchten mit 3-Methyl-cyclohexenon als Ausgangsstoff Allocyathin B<sub>2</sub> in 19 Schritten zu synthetisieren. Die gesamte Ausbeute betrug nur 0,5%. Watanabe *et al.* (2007) veröffentlichten eine enantioselektive Volsynthese von Erinacin B, die erst nach 33 Schritten mit einer Gesamtausbeute von 3,0% abgeschlossen werden konnte. Die chemische Synthese von Erinacin E ist ebenfalls sehr aufwendig. Nach 39 Schritten konnte lediglich eine Gesamtausbeute von 0,9% erreicht werden (Watanabe und Nakada, 2008a).

In den vergangenen Jahren wurden insgesamt 16 Cyathan-Diterpenoide chemisch synthetisiert. Diese sind Cyathin A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub>, Allocyathin B<sub>2</sub> und B<sub>3</sub>,

Cyanthiwigin AC, B, F, G, U, W und Z, Erinacin A, B und E, Sarcodonin G und Scabronin A (Wright und Whitehead, 2000; Enquist und Stoltz, 2009; Kim und Cha, 2009; Enquist *et al.*, 2011). Für die in der vorliegenden Arbeit isolierten Substanzen (Striatale, Striatine und Erinacin C/P) gibt es nach aktuellem Wissensstand noch keine erfolgreiche chemische Synthese. Die meisten Publikationen beschrieben lediglich sehr geringe Ausbeuten (< 5%). Der Syntheseaufwand ist groß, da vom Ausgangsstoff bis zur Zielsubstanz mindestens 15 Syntheseschritte erforderlich waren. Dazu wurden zum Teil giftige, gesundheitsschädliche und umweltgefährdende Reagenzien eingesetzt. Darüber hinaus wurden Isomere bzw. racemische Produkte gebildet. Für den Synthesechemiker sind solche Naturstoffe heute immer noch eine Herausforderung. Er muss stereochemische und regioselektive Kriterien beachten, um diese komplizierten Verbindungen gezielt synthetisieren oder verändern zu können. Aufwendige und komplizierte Syntheseschritte machen eine Umsetzung in den präparativen Maßstab oft unökonomisch. Mittels biotechnologischer Verfahren lässt sich ein ökonomisch wesentlich günstigerer Zugang zu den Cyathan-Diterpenoiden ermöglichen und damit die Forschung auf diesem Gebiet vorantreiben.

### **3.2.2 Biotechnologische Produktion**

Bei der Produktion von Naturstoffen spielen Mikroorganismen eine wesentliche Rolle, da sie viele Vorteile gegenüber anderen Organismen besitzen. Zum einen können sie unter kontrollierten Bedingungen im Labor kultiviert werden. Viel aufwendiger ist ein Anbau von Pflanzen mit einer Abhängigkeit vom Klima oder eine Züchtung von Tieren. Zum anderen zeichnen sich die meisten Mikroorganismen durch einen schnellen Stoffwechsel und eine große Wachstumsrate aus. Wie oben diskutiert, gibt es eine Vielzahl an Literatur über natürlich vorkommende Cyathan-Diterpenoide. Allerdings fehlen meist Angaben zur Produktkonzentration, wenn diese Cyathan-Diterpenoide biotechnologisch produziert wurden. Beispiele dazu sind in der Tabelle 3.2 dargestellt. Die Optimierung der Erinacin C-Bildung wurde bisher noch nicht beschrieben.

Tabelle 3.2: Biotechnologische Gewinnung von Cyathan-Diterpenoiden.

Literatur	Organismus	Hauptprodukte	Maßstab	Dauer	Konzentration [mg L <sup>-1</sup> ]
Böker, 1990, Arnoldi, 1990	<i>C. striatus</i>	Striatine A, B, C	20 L Fermenter Fed-batch	200 h	~ 1270
Rabe, 1989	<i>C. striatus</i>	Striatine A, B, C	20 L Fermenter Batch	140 h	~ 585
Krzyczkowski <i>et al.</i> , 2010	<i>H. erinaceus</i>	Erinacin A	10 L Fermenter Batch	8 d	~ 192 ± 42
Dixon <i>et al.</i> , 2011	<i>C. helenae</i>	Cyathin A <sub>3</sub>	125 mL Erlenmeyer- kolben	15 d	~ 936
vorliegende Arbeit	<i>H. erinaceus</i>	Erinacin C, P	1 L Erlenmeyer- kolben	9 d 3 d	~ 257 für C ~ 184 für P

In der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, dass die Produktkonzentration von Erinacin C sehr stark vom Substrat abhängig war (2.2.1.1 und 2.2.1.2). Abbildung 2.7 verdeutlicht den Einfluss der verwendeten Substrate auf die Erinacin C-Produktion. Edamin<sup>®</sup> K als eine komplexe Stickstoffquelle wirkte sich positiv auf die Erinacin C-Bildung aus. Da Edamin<sup>®</sup> K ein enzymatisches Hydrolysat aus Laktalbumin ist, ließ sich nicht feststellen, welche Komponente bzw. welche Aminosäure zu der hohen Konzentration beitrug. Das Ergebnis aus Medium 2 deutet auf die Bedeutung von Hafermehl für die Erinacin C-Produktion hin. Hafermehl, ebenfalls ein komplexer Medienbestandteil, besteht aus Kohlenhydraten, Lipiden, Proteinen, Mineralstoffen und Vitaminen. Im Medium 2 standen hinreichend Kohlenstoffquellen, vor allem die einfach verwertbare Glucose, zur Verfügung. Allerdings konnte in diesem Medium kein Erinacin C nachgewiesen werden. Daher ist zu vermuten, dass Hafermehl als eine wichtige Stickstoffquelle fungierte. Abbildung 2.8 zeigt, dass Erinacin C im Medium 7 (ohne Hafermehl) zwar gebildet wurde, allerdings in wesentlich geringerer Menge als im Medium 6 (mit Hafermehl). Hafermehl besteht zu ca. 14% aus Proteinen (Deutsches

Ernährungsberatungs- und Informationsnetz, 2013). Daraus ergab sich im Medium 6 eine Proteinkonzentration von  $0,7 \text{ g L}^{-1}$  allein durch das Hafermehl ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ). Die geringere Erinacin C-Konzentration bei der Kultivierung im Medium 7 (ohne Hafermehl) war somit wahrscheinlich auf eine niedrigere Proteinkonzentration zurückzuführen.

Aus 583 mg Rohextrakt konnten 47,8 mg Erinacin C gewonnen werden. Damit betrug die gewinnbare Erinacin C-Menge bezogen auf die Rohextraktmenge 8,2%.

Die maximale Erinacin P-Konzentration war bereits nach 3 Tagen erreicht (Abbildung 2.16). Ma *et al.* (2008) beschrieben in einem Patent eine Kultivierungsdauer von 15 bis 30 Tagen zur Produktion von Erinacin P mit einer Gesamtausbeute von 2~3%. Im Vergleich dazu war die Kultivierungsdauer in der vorliegenden Arbeit wesentlich kürzer. Dies bedingt einen wirtschaftlichen Vorteil. Aus 30 mg Ethylacetat-Rohextrakt wurde ca. 1 mg Erinacin P gewonnen; die gewinnbare Erinacin P-Menge bezogen auf den Rohextrakt betrug ca. 3,3%. Die Ergebnisse wiesen auf eine schnelle und effiziente Produktion von Erinacin P hin. Wegen seiner Eigenschaft als biosynthetisches Intermediat könnte Erinacin P als Vorstufe bzw. Leitstruktur für vielversprechende Derivate, wie z. B. Erinacine A, B und C bzw. Striatale, die eine entsprechende längere Kultivierungsdauer benötigen, dienen.

Eine weitere Konzentrationssteigerung der Erinacine ist durch verschiedene Optimierungsstrategien möglich, z. B. durch Coinkubation mit Bakterien (Dixon *et al.*, 2011), durch zeitliche Zufütterung von Substraten (Böker, 1990; Arnoldi, 1990; Wang *et al.*, 1999), durch Variation des C/N-Verhältnisses (Rabe, 1989; Lee *et al.*, 2007; Lin und Chen, 2007; Alarcon und Aguila, 2006), durch Zugabe von Vorstufen (Böker *et al.*, 2001; Turło *et al.*, 2008; Kenji *et al.*, 2002) und durch Temperatur und pH-Einstellung (Wu *et al.*, 2006; Lin und Sung, 2006).

### 3.3 UV-A-Bestrahlung während der Submerskultivierung

Elektromagnetische Strahlung (Licht) ist für das Leben auf der Erde von fundamentaler Bedeutung. Der Ablauf vieler biologischer Prozesse ist direkt oder indirekt vom Licht abhängig. Da Pilze heterotrophe Organismen sind und sich wie Tiere von organischen Nährstoffen ihrer Umgebung ernähren, ist Licht für ihr Wachstum entbehrlich. Dennoch sind Reaktionen auf Licht bei Pilzen bekannt. Licht, vor allem bestimmte Wellenlängen des Lichtes, kann das Wachstum, den Sekundärstoffwechsel, die Enzymaktivität und die Produktion von Metaboliten von Pilzen beeinflussen.

Taupp *et al.* (2008) berichteten eine Steigerung der Biomassebildung sowie der Himbeerketonproduktion von *Nidula niveo-tomentosa* (Henn.) Lloyd bei einer Kultivierung mit einem 10 Stunden UV-A-Strahlung / 14 Stunden Dunkel-Rhythmus. Einige stress- und wachstumsabhängige Proteine wurden durch die UV-A-Strahlung hochreguliert. Ramírez *et al.* (2010) untersuchten den Einfluss verschiedener Wellenlängen (UV 280-320 nm, blau 450-495 nm, grün 495-570 nm, gelb 570-590 nm, rot 620-750 nm und weißes Licht) auf die Lignin-Peroxidase-Aktivität in Submerskulturen von *Phanerochaete chrysosporium* und stellten dabei fest, dass durch grünes Licht eine Steigerung der Enzymaktivität um 27% erzielt wurde. Eine UV-Bestrahlung zeigte hingegen negative Effekte sowohl auf die Enzymaktivität als auch auf die extrazelluläre Proteinkonzentration. Zheng *et al.* (2009) beschrieben ein gesteigertes Mycelwachstum und eine niedrigere Polyphenolproduktion von *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat bei der Kultivierung unter Blau- (490 nm) bzw. unter Rotlicht (650 nm) im Vergleich zur Kultivierung im Dunkeln und bei Tageslicht. Außerdem war die Zusammensetzung der gebildeten Polyphenole unter unterschiedlicher Belichtung anders. Die Autoren vermuteten, dass hier Photorezeptoren des Pilzes eine Rolle spielten. Diese konnten unterschiedliche Strahlung wahrnehmen und dann entsprechend den Biosyntheseweg ändern. Corrochano (2007) beschrieb ebenfalls, dass die Reaktion der Pilze auf Strahlung von Photorezeptoren abhing. Durch Belichtung änderten sich die zelluläre Entwicklung und der Metabolismus. Beim Ascomycet

*Neurospora crassa* wurde z. B. blaues Licht durch einen *White Collar* (WC)-Proteinkomplex wahrgenommen. Bei *Aspergillus nidulans* wurde von Bayram *et al.* (2008) eine inhibierende Wirkung von Licht auf die Bildung der Sekundärmetabolite nachgewiesen. Die Autoren beschrieben, dass der VelB/VeA/LaeA-Proteinkomplex durch Licht unterdrückt wurde, so dass eine negative Regulierung der Sekundärmetabolitbildung eintrat.

In der vorliegenden Arbeit wurde UV-A-Bestrahlung bei der Submerskultivierung von *H. erinaceus* zur Erinacin C-Produktion eingesetzt. Dabei wirkte sich das Licht sowohl auf das Biomassewachstum, als auch auf die Erinacin C-Bildung negativ aus.

## 3.4 Lokalisierung der Metabolite

### 3.4.1 MALDI-MS-Imaging von Basidiomyceten

MALDI-MS-Imaging ist ein in den letzten 20 Jahren entwickeltes Werkzeug zur Untersuchung der räumlichen Verteilung von Biomolekülen, wie z. B. Proteinen, Peptiden, Lipiden, Drogen oder Metaboliten in Gewebepräparaten (Seeley *et al.*, 2011; Greer *et al.*, 2011). Bislang findet diese Technik überwiegend im klinischen und pharmazeutischen Bereich zur Diagnose und Prognose von Krankheiten oder zum Informationsgewinn über die Lokalisierung und den Metabolismus von Drogen im Zielorgan oder im Gewebe Einsatz. Zum Beispiel kann die räumliche Verteilung des Phosphatidylcholins, dessen Menge im Fall eines bösartigen Brusttumors erhöht wird, in einem Tumorschnitt mittels MALDI-MS-Imaging bestimmt werden (Amstalden van Hove *et al.*, 2010). Schober *et al.* (2012) analysierten die Verteilung tryptischer Peptide im Mäusegehirn mit Hilfe von hochauflösendem MALDI-MS-Imaging und ermöglichten damit eine Analyse und Identifizierung der Proteine direkt im Gewebe. Dies kann z. B. für die Identifizierung krankheitsspezifischer Biomarker in Gewebekompartimenten angewendet werden. Shanta *et al.* (2012) zeigten verschiedene Verteilungsbilder von Donepezil (ein Arzneimittel zur Behandlung bestimmter Formen von leichter bis mittelschwerer Vergesslichkeit) im Gehirn, in der Niere sowie in der Leber einer Maus eine Stunde nach der oralen Einnahme. Dieses Ergebnis unterstützt die Untersuchung des Stoffwechselwegs und der Dosierung des Medikamentes.

In der letzten Zeit wurde MALDI-MS-Imaging auch für Bakterien (Liu *et al.*, 2010; Blaze M. T. *et al.*, 2012), Pflanzen (Peukert *et al.*, 2012) und Insekten (Schoenian *et al.*, 2011) eingesetzt. Die Verteilung der wasserlöslichen Oligosaccharide im Stängel vom Weizen *Triticum aestivum* ließ sich durch MALDI-MS-Imaging bestimmen. Es wurde gezeigt, dass diese Technik genau so empfindlich war wie die gut etablierten LC-MS-Methoden (Robinson *et al.*, 2007). Mittels MALDI-MS-Imaging konnten z. B. auch Pestizide im Stiel der Sojabohnen (Mullen *et al.*, 2005) oder in der kompletten Sonnenblume (Anderson *et al.*, 2009) nachgewiesen werden.



Zur Untersuchung von Basidiomyceten wurde das MALDI-MS-Imaging bislang wenig genutzt. Jaeger *et al.* (2013) berichteten über die Möglichkeit mit Hilfe des MALDI-MS-Imagings ein Screening auf Naturstoffe wie  $\beta$ -Carbolin Alkaloide im Fruchtkörper von *Mycena metata* durchzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Submerskulturen von Basidiomyceten am Beispiel von *C. striatus* und *H. erinaceus* mittels MALDI-MS-Imaging zur Lokalisierung von Sekundärmetaboliten untersucht.

In der Mitte des Pellets aus Submerskultur von *H. erinaceus* war die Signalintensität höher als am Rand (Abbildung 2.30). Das könnte auf die Löslichkeit und den Transport der Substanz in das umgebende Medium zurückzuführen sein. Durch den Vergleich der identifizierten Sekundärmetabolite im Fruchtkörper von *H. erinaceus* mit denen in Submerskultur (Abbildung 2.30, Abbildung 2.31, Abbildung 2.33, Abbildung 2.34 und Tabelle 2.8) wurde gezeigt, dass Erinacine in Spuren im Fruchtkörper vorlagen, und Hericenone in Spuren in Submerskultur vorhanden waren. Bislang wurden Hericenone ausschließlich im Fruchtkörper von *H. erinaceus* nachgewiesen, während Erinacine nur in der Submerskultur bekannt waren (Ma *et al.*, 2010). Der Grund dafür könnte die sehr geringe Substanzmenge sein, die die Isolierungsarbeit erschwert.

Die in dieser Arbeit verwendete MALDI-MS-Imaging Technik hat ein Massenfenster von  $\Delta m/z = 0.01$ , eine Hochauflösung von 140.000 und eine Massengenauigkeit von  $< 2$  ppm. Somit ist gewährleistet, dass das dargestellte Verteilungsbild lediglich eine einzige Verbindung (Isomere exklusiv) repräsentiert. So beträgt z. B. die Massendifferenz zwischen dem Natriumaddukt von Striatal C ( $m/z = 469,21973$ ) und dem Kaliumaddukt von Striatal D ( $m/z = 469,19843$ ) nur 0,02130 Da, im Fall des Kaliumaddukts von Striatal A ( $m/z = 511,20920$ ) und des Natriumaddukts von Striatal B ( $m/z = 511,23032$ ) nur 0,02112 Da. Auf Grund der Hochauflösung können diese aber eindeutig differenziert werden (Abbildung 3.7). Dies zeigt, dass MALDI-MS-Imaging eine sichere Methode zur Identifizierung einer Substanz ohne Aufstockung mit einem internen Standard ist. Es ist möglich, diese Methode als Screeningverfahren zum Nachweis bioaktiver Substanzen in Basidiomyceten einzusetzen, um neue potentielle Produzenten von interessanten bioaktiven Substanzen zu finden. Eine Limitierung dieser Methode ist, dass

Isomere damit nicht differenziert werden können. So werden z. B. die Erinacine A, B, E und F ( $C_{25}H_{36}O_6$ ) oder Hericerin und Isohericerin ( $C_{27}H_{33}NO_3$ ) mit denselben  $m/z$  detektiert. Dadurch stellt das Verteilungsbild wahrscheinlich eine Mischung der Isomere dar. Das gleiche Problem wurde auch von Huang *et al.* (2012) bei der Abbildung von Triterpenoiden im getrockneten Fruchtkörper von *Ganoderma lucidum* und *Antrodia camphorata* mittels *Electrospray Laser Desorption Ionization* Massenspektrometrie berichtet. Eine Kombination mit MS-MS zur weiteren Fragmentierung der Isomere könnte zusätzliche Informationen über eine sicherere Zuordnung der Isomere geben.

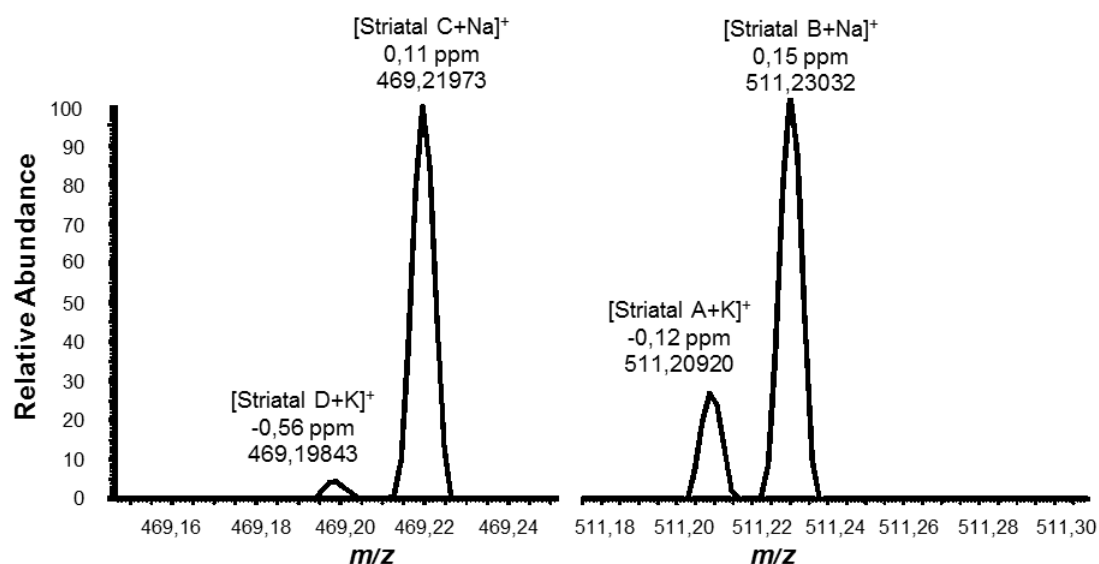


Abbildung 3.7: Massenspektren. Links: Natriumaddukt von Striatal C ( $m/z = 469,21973$ ) und Kaliumaddukt von Striatal D ( $m/z = 469,19843$ ) mit  $\Delta m/z = 0,02130$  Da; Rechts: Kaliumaddukt von Striatal A ( $m/z = 511,20920$ ) und Natriumaddukt von Striatal B ( $m/z = 511,23032$ ) mit  $\Delta m/z = 0,02112$  Da.

Eine weitere Limitierung dieser Methode liegt in der Dimension der zu analysierenden Probe im Vergleich zur Laser-Pixelgröße (räumliche Auflösung in  $\mu m$ ). Wenn die verwendete Pixelgröße klein genug wäre, könnte die Lokalisierung der Substanz die zelluläre bzw. subzelluläre Ebene erreichen.

Für das MALDI-MS-Imaging bestehen bezüglich der Matrix noch Möglichkeiten zur Optimierung der Signalintensität. Bei unterschiedlicher Polarität der Analyten

(Erinacine und Hericenone) benötigt man eine passende Matrix, um die Targetsubstanzen optimal zu ionisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde eine gängige DHB Matrix verwendet. Shanta *et al.* (2012) beschrieben eine Kombination von zwei Matrixsubstanzen (3-Hydroxycoumarin und 6-Aza-2-thiothymine), damit verschiedene kleine Moleküle inkl. Aminosäuren mit höherer Signalintensität nachgewiesen werden können.

Insgesamt ist MALDI-MS-Imaging eine sensitive Methode mit einfacher Probenvorbereitung. Sie verfügt über ein großes Potenzial im Bereich der Basidiomycetenforschung. Nicht nur Terpenoide, sondern auch viele andere Verbindungsklassen wie Aminosäuren, Zucker, Lipide und Alkaloide können mittels MALDI-MS-Imaging nach ähnlichem Protokoll *in situ* analysiert werden. Um Lebensvorgänge der Pilze besser verstehen zu können, sollten nicht nur die molekularen Strukturen dieser Stoffe aufgeklärt werden. Vielmehr muss auch untersucht werden, wo sich diese Stoffe in den Zellen in bestimmten Situationen befinden und wie sie metabolisiert werden und miteinander reagieren.

### 3.4.2 Zellaufschluss

Basidiomyceten produzieren eine Reihe interessanter Sekundärmetabolite. Einige davon werden als extrazelluläre Produkte sekretiert, wie z. B. Enzyme, Aromen und Exopolysaccharide. Dagegen sind einige Metabolite intrazelluläre Produkte, wie z. B. Lipide, DNA, zytoplasmatische Proteine. Die Gewinnung von solchen intrazellulären Produkten beginnt mit einem Zellaufschluss. Da die Cyathan-Diterpenoide innerhalb des Mycelpellets lokalisiert sind, sollte in der vorliegenden Arbeit eine Steigerung der Produktgewinnung mit Hilfe eines Zellaufschlusses erzielt werden.

Viele Forschungsarbeiten beschäftigten sich mit dem Zellaufschluss von Hefen oder Bakterien, z. B. *Saccharomyces cerevisiae* (Shynkaryk *et al.*, 2009; Heim *et al.*, 2007; Ricci-Silva *et al.*, 2000) oder *Escherichia coli* (Ho *et al.*, 2008; Tkac *et al.*, 2004). Einige beschäftigten sich mit Zellaufschluss von Mikroalgen (Lee *et al.*, 2012), z. B. *Chlorella sp.* (Doucha und Livansky, 2008; Zheng *et al.*, 2011), *Schizochitrium limacinum*, *Chlamydomonas reinhardtii* (Gerde *et al.*, 2012) oder *Chlorococcum sp.* (Halim *et al.*, 2012). Über den Zellaufschluss von filamentösen Pilzen, besonders von Basidiomyceten, ist bislang wenig bekannt.

Die Zellwand von filamentösen Pilzen besteht aus Chitin, Glucan, Mannan und Glycoproteinen, wobei das Chitin wesentlich zur Integrität der Zelle beiträgt (Bowman und Free, 2006). Bei den meisten Hefen beträgt der Anteil von Chitin zwischen 0,2-1% der Trockenmasse der Zellwand (Nguyen *et al.*, 1998). Dagegen kann der Anteil von Chitin bei filamentösen Pilzen bis zu 20% betragen. Zum Beispiel bestand die Trockenmasse der Zellwand von *Penicillium roqueforti* zu 19% aus Chitin (Andriianova *et al.*, 2011), von *Agaricus bisporus* zu 9,6%, von *Pleurotus eryngii* zu 3,6%, und von *Lentinula edodes* zu 2,5% (Nitschke *et al.*, 2011). Aus diesem Grund können die üblichen Protokolle für den Zellaufschluss von Hefen oder Bakterien nicht direkt auf filamentöse Pilze übertragen werden. Protokolle zur Freisetzung von niedermolekularen Naturstoffen aus filamentösen Pilze wurden kaum beschrieben.

In dieser Arbeit wurden mechanische Methoden (Aufschluss mittels Ultra-Turrax und kontinuierlich arbeitender Rührwerkskugelmühle, Abbildung 2.35) bei den

beiden Basidiomyceten *C. striatus* und *H. erinaceus* angewendet und optimiert. Bei der Gewinnung der Cyathan-Diterpenoide konnte eine Steigerung von 89% im Vergleich zum Referenzwert für die Striatale A/B (Abbildung 2.36) und von 53% für Erinacin C (Abbildung 2.44) erzielt werden. Als am besten geeignet erwies sich der Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle. Da das Mycel in Submerskultur häufig eine Pelletform (kugelförmig, Durchmesser 2-3 mm, zum Teil mit Stacheln auf der Pelletoberfläche) bildet, ist ein direkter Einsatz der Rührwerkskugelmühle nicht effektiv. Erst durch die Kombination von Ultra-Turrax und Rührwerkskugelmühle wurde die maximale Produktkonzentration erzielt. Diese Ergebnisse werden durch die Untersuchung von Taubert *et al.* (2000) bestätigt. Sie untersuchten verschiedene Zellaufschlussmethoden, wie z. B. Ultra-Turrax, Rührwerkskugelmühle, Lyophilisation und Lyse durch organische Lösungsmittel zur Freisetzung von Glukose-6-phosphat Dehydrogenase aus *Ganoderma applanatum* und *Pycnoporus cinnabarinus*, und stellten fest, dass der Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle die beste Option für filamentöse Pilze ist. Eine Kombination von zwei Aufschlusstechniken ist manchmal bei filamentösen Pilzen wegen der Mycelform nicht vermeidbar. Wegen diverser Wachstumsformen der Pellets von verschiedenen Basidiomyceten sind die in dieser Arbeit bestimmten optimalen Bedingungen für einen Zellaufschluss nur bedingt auf andere Pilzarten übertragbar.

Taskova *et al.* (2006) beschrieben drei Zellaufschlussmethoden (Mörsern unter flüssigem Stickstoff, Rührwerkskugelmühle und enzymatische Lyse) zur Freisetzung von DNA, RNA, Proteinen, Glucose-6-phosphat Dehydrogenase, Katalase sowie der Menge an mit Methanol extrahierbaren Verbindungen aus *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina*. Der Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle wurde auch hier als Methode zur Isolierung von intrazellulären Enzymen bevorzugt und als effektive Methode zur Gewinnung von Sekundärmetaboliten bestätigt. Durch Einsatz der Rührwerkskugelmühle wurden in dieser Arbeit die höchsten Konzentrationen an Gesamtprotein und Sekundärmetaboliten freigesetzt. Die Extraktion der Cyathan-Diterpenoide nach dem Zellaufschluss wurde durch die größere Oberfläche begünstigt.

Die von Taskova *et al.* (2006) vorgestellte Zellaufschlussmethode durch enzymatische Lyse kam in der vorliegenden Arbeit nicht in Frage. Eine enzymatische Lyse der Zellwand ist im Labormaßstab möglich, kommt aber für eine Anwendung im industriellen Maßstab wegen der zu hohen Kosten und der Verunreinigung der Produkte nicht in Frage. Die von Taubert *et al.* (2000) verwendete Methode Gefriertrocknung ist sehr energieintensiv. Die Rührwerkskugelmühle wird sowohl in vielen Laboren, als auch im industriellen Maßstab eingesetzt, da sie einfach, schnell und kostengünstig arbeitet. Für Hefen, Mikroalgen und filamentöse Mikroorganismen ist diese Methode besonders geeignet (Doucha und Livansky, 2008; Chisti und Moo-Young, 1986). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sich nach dem Zellaufschluss eine homogene Suspension bildet, die dann die Flüssig-Feststoff-Trennung erschwert. Wenn das gewünschte Produkt in der verwendeten Flüssigkeit gut löslich ist, sollte die Flüssigkeit ebenfalls extrahiert werden, um Produktverluste zu vermeiden. In diesem Fall ist eine Flüssig-Feststoff-Trennung nicht unbedingt erforderlich. Wenn das gewünschte Produkt in der verwendeten Flüssigkeit schlecht oder nicht löslich ist (die Striatale sind z. B. in Puffer oder Kulturüberstand schlecht löslich), ist eine Flüssig-Feststoff-Trennung notwendig. Dies lässt sich z. B. durch Zentrifugation, Membranfiltration oder Abnutschen erreichen. Es ist zu erwähnen, dass die Gewinnung der Zielprodukte aus dem Mycel wesentlich aufwendiger und teurer ist, als die Gewinnung aus dem Kulturüberstand. Zum einen werden nach dem Zellaufschluss viele unerwünschte Produkte des Pilzes, wie z. B. Fettsäuren, Sterole, Lipide und Proteine, ebenfalls freigesetzt, die entfernt werden müssen. Zum anderen wird die Extraktion der Zielprodukte durch das am Mycel haftende Antischaummittel, das im industriellen Maßstab in der Regel eingesetzt wird, erschwert. Es wäre ideal, wenn der biotechnologische Prozess so gesteuert werden könnte, dass eine hohe Produktkonzentration aus dem Kulturüberstand erhalten werden könnte und das Mycel möglichst nicht miteinbezogen werden müsste.

### 3.5 HPTLC vs. HPLC-DAD

Die HPTLC wird in der Lebensmittelanalytik häufig als Methode eingesetzt, um Farbstoffe, Zucker, Antioxidantien oder Süßstoffe nachzuweisen. Bei der Analyse von Naturstoffen wird aufgrund komplexer Matrixbestandteile vorwiegend die HPLC verwendet. Jedoch ist heute der Einsatz der HPTLC auch auf dem Naturstoffgebiet weit verbreitet. Zum Beispiel konnten drei Sesquiterpenoide (Solavetivon, Aristolon und Nootkaton) aus dem Aceton-Extrakt von *Cyperus rotundus* mittels HPTLC identifiziert und quantifiziert werden. Mit Hilfe einer Derivatisierung mit dem DPPH-Radikal-Reagenz ließ sich die antioxidative Aktivität der Sesquiterpenoide zeigen. Die Validierungsuntersuchung der HPTLC zeigte keine signifikanten Unterschiede zu der gängigen HPLC-Methode (Priya Rani und Padmakumari, 2012). Fünf spezifische Triterpenoide aus *Betula utilis*, wie z. B. Betulin und Lupeol, konnten mittels HPTLC simultan quantitativ bestimmt werden. Die validierte Methode wurde als einfach, reproduzierbar, und robust beschrieben (Khan *et al.*, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde die HPTLC zur Analyse der Sekundärmetabolite aus Submerskulturen von *H. erinaceus* eingesetzt. Als Methode zur qualitativen Bestimmung der Substanzen ist die HPTLC ohne weiteres einsetzbar, wie sich im Vergleich mit der HPLC-DAD-Methode zeigte. Bei der Produktkinetik von Erinacin P wurde mit beiden Methoden ein vergleichbarer Verlauf registriert (Abbildung 2.16 und Abbildung 2.17). Mittels TLC-MS-Kopplung konnte in der vorliegenden Arbeit die Masse von Erinacin P ( $hR_F = 34$ ) ermittelt werden (Abbildung 2.23). Mittels HPTLC gelang es zusätzlich anhand der DPA-Derivatisierung, den Xylose-Anteil von Erinacin P durch eine Gelbfärbung nachzuweisen.

Zusätzlich bietet die HPTLC auch die Möglichkeit, die Bioaktivität der Metabolite zu untersuchen. Kastner *et al.* (2010) wiesen mit Hilfe von *Vibrio fischeri* Mycotoxine aus Lebensmitteln auf der HPTLC-Platte nach. In dieser Arbeit konnten zwei Substanzen ( $hR_F = 34$  und 49) mit stark hemmender Wirkung auf das gramnegative Bakterium *Vibrio fischeri* aus dem Rohextrakt von *H. erinaceus* identifiziert werden (Abbildung 2.19). Damit wurde die bereits von Anke *et al.*

(2002) beschriebene antibakterielle (sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien) Wirkung von Erinacin P bestätigt.

Schwierigkeiten gab es bei der Strukturzuordnung der Substanz 2. Sowohl die Substanz 2 aus dem Rohextrakt, als auch Reinsubstanz von Erinacin P ergaben nach der Isolierung von der HPTLC-Platte keine vollständige Übereinstimmung in den NMR-Spektren mit der ursprünglichen Reinsubstanz. Zum einen stimmten die Verschiebungsdaten der  $^1\text{H}$ -Messung nur zum Teil mit der des Reinstoffs Erinacin P überein. Die zusätzlichen Signale könnten auf Plattenbindematerialien zurückzuführen sein. Ähnliche Schwierigkeiten wurden bei der Untersuchung der Sekundärmetabolite von *Colletotrichum gloeosporioides* mittels HPTLC beschrieben. Die  $^1\text{H}$ -Spektren und MS-Spektren zeigten so viele Verschiedenheiten, dass eine sinnvolle Interpretation nicht möglich war (Abang *et al.*, 2009). Zum anderen war eine  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messung nicht möglich, da die aus einer HPTLC-Platte isolierte Substanzmenge nur im unteren Mikrogramm-Bereich lag. Adhami *et al.* (2013) mussten 20 HPTLC-Platten einsetzen, damit ihnen die Strukturaufklärung von zwei bioaktiven Naturstoffen aus dem Galbanharz von *Ferula gummosa* (Boiss.) gelang. Damit war ein Zeitvorteil der HPTLC gegenüber der HPLC nicht mehr gegeben. Dennoch gibt es in der Literatur bereits Berichte über eine erfolgreiche Strukturbestätigung. So konnten von Gössi *et al.* (2012) die  $^1\text{H}$ -Spektren von Rutin, Kaffeesäure, Chlorogensäure und Amiodaron mittels TLC-NMR bestätigt werden. Die Autoren gaben an, dass eine NMR-Analyse bereits mit 3  $\mu\text{g}$  Substanzmenge möglich war. Demnach ist die Kombination von HPTLC und NMR zur Strukturbestätigung von Naturstoffen durch direkte Elution von einer Platte möglich. Die gilt aber lediglich für die  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse.

In Tabelle 3.3 sind nochmals beide Analysemethoden (HPTLC und HPLC-DAD) im Vergleich dargestellt. Man kann daraus schließen, dass aufgrund des hohen Probendurchsatzes und den unterschiedlichen Derivatisierungsmöglichkeiten sowie der direkten Bestimmung der Bioaktivität die HPTLC im Vergleich zur HPLC wirtschaftlicher ist.



Tabelle 3.3: HPTLC vs. HPLC-DAD am Beispiel von Rohextrakten aus *H. erinaceus*.

	HPTLC	HPLC-DAD
Zeit	25 min für 18 Proben gleichzeitig	50 min/Probe
Lösungsmittelaufwand	10 mL für 18 Proben	20 mL/Probe
UV-Spektrum	möglich	möglich
Wellenlängenmessung	beliebig viele Wellenlängen	4 Wellenlängen
Kombination mit MS	möglich	möglich
Charakterisierung der Substanzen	durch Derivatisierungsreagenzien	nicht möglich
Bioaktivität	durch <i>Vibrio fischeri</i>	möglich erst nach Fraktionierung
Kombination mit NMR	noch fraglich	möglich

### 3.6 ELISA

In der vorliegenden Arbeit wurde ein indirekt kompetitiver ELISA entwickelt, um Cyathan-Diterpenoide nachzuweisen. Abbildung 3.8 zeigt das Prinzip eines indirekten ELISA.

#### Indirekt nicht kompetitiver ELISA

#### Indirekt kompetitiver ELISA

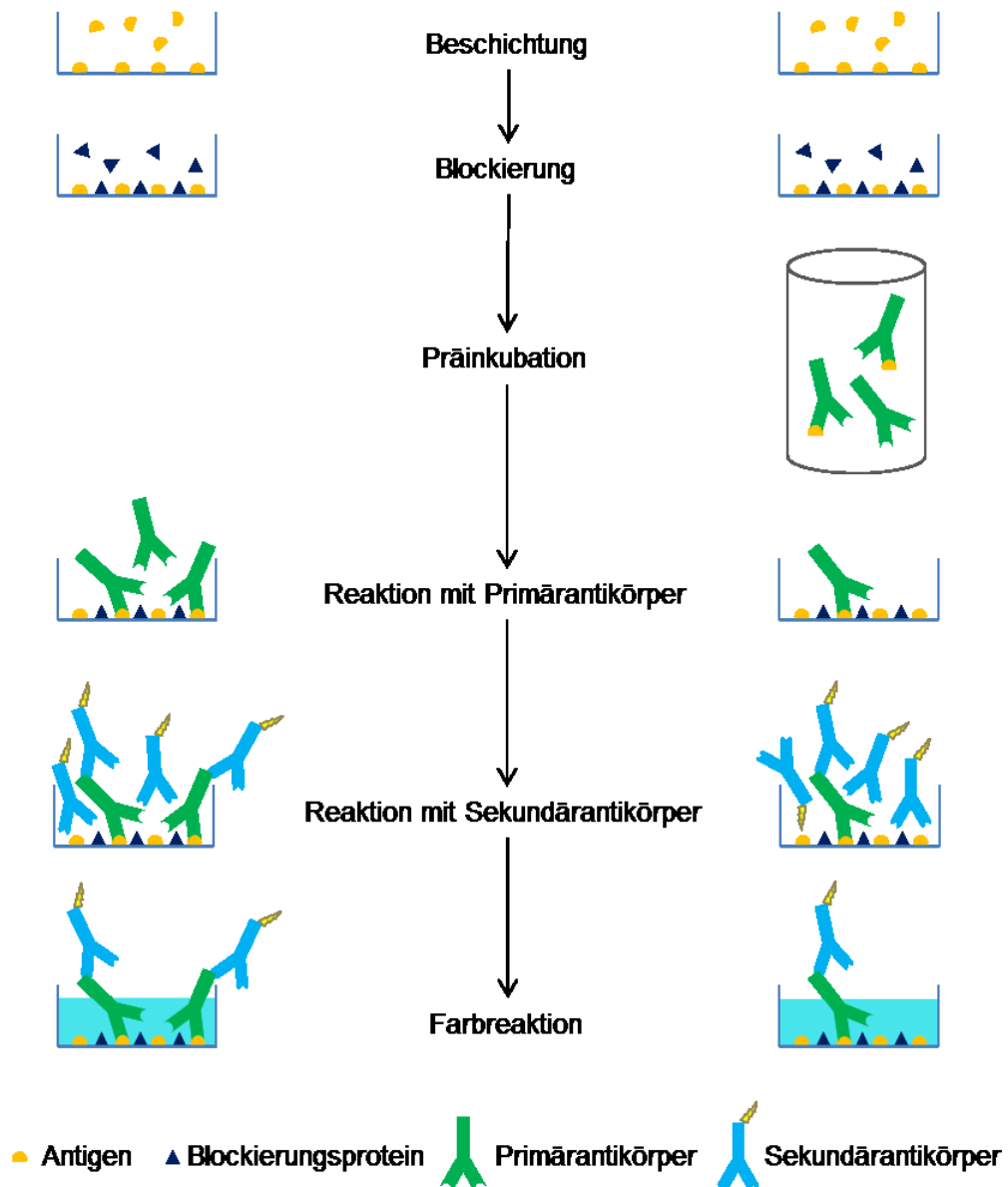


Abbildung 3.8: Prinzipschema des indirekten ELISA.

**Beschichtung von Haptenen auf der Mikrotiterplatte**

In den meisten Fällen ziehen es Wissenschaftler vor, die Mikrotiterplatten mit einem Hapten-Protein-Konjugat zu beschichten. Zum einen bestehen die Mikrotiterplatten aus Polystyrol, so dass Proteine über eine höhere Affinität zu diesem Plattenmaterial verfügen als Haptene. Zum anderen fehlt es meistens bei den Haptenen an funktionellen Gruppen, wie z. B. Carboxylgruppen, Hydroxylgruppen oder Aminogruppen, die eine direkte Bindung auf der Platte ermöglichen. Haptene werden häufig an Ovalbumin (Xu *et al.*, 2005; Brun *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009; Sathe *et al.*, 2011), BSA (Jahn *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2009), oder HSA (Human Serum Albumin) (Zeng *et al.*, 2007; Tothiam *et al.*, 2011) gekoppelt. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings ein niedermolekulares Hapten, Striatal B, direkt an die Mikrotiterplatte gebunden, weil die obengenannte Methode mit vielen Nachteilen verbunden ist:

1. Die Herstellung des Hapten-Protein-Konjugats ist nicht immer reproduzierbar, d. h. das Kopplungsverhältnis kann variieren, sogar dann, wenn das Konjugat unter denselben Reaktionsbedingungen hergestellt wird. Eine Bestimmung des Kopplungsverhältnisses mittels MS ist vor dem Assay immer erforderlich. Da unterschiedliche Kopplungsverhältnisse unterschiedliche Hapten-Mengen bei der Beschichtung bewirken, ist eine Standardisierung des Assays schwierig und Schwankungen der Assay-Sensitivität sind kaum zu vermeiden (Fujiwara und Kitagawa, 1993; Feng *et al.*, 2009; Wortberg *et al.*, 1996a).
2. Eine Präzipitation der Proteine oder des Konjugats kann während der Konjugatherstellung durch die Abschirmung von hydrophilen funktionellen Gruppen ( $-\text{COOH}$  oder  $-\text{NH}_3^+$ ) von den hydrophoben Haptenen hervorgerufen werden (Feng *et al.*, 2009).
3. Aufgrund der großen molekularen Dimension der Trägerproteine kann ein räumlicher Abschirmeffekt für die Haptene entstehen, so dass die Bindung bzw. die Zugänglichkeit der spezifischen Antikörper an die Haptene erschwert ist (Feng *et al.*, 2009; Sathe *et al.*, 2011).
4. Die Sensitivität eines durch Hapten-Protein-Konjugat beschichteten ELISA war meist deutlich schlechter als bei einer direkten Hapten-Beschichtung (Kaur *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2009).

5. Ein Verlust der wertvollen Haptene ist bei der Herstellung des Konjugats meistens nicht vermeidbar.

Einige Wissenschaftler haben versucht, die Plattenoberfläche vor der Beschichtung zu aktivieren oder zu modifizieren, um eine direkte Bindung von Haptenen zu ermöglichen. In Tabelle 3.4 sind Beispiele der Maßnahmen zur Vorbehandlung der Mikrotiterplatte dargestellt. Solche Maßnahmen sind allerdings zeitaufwendig.

Tabelle 3.4: Beispiele zur Vorbehandlung der Mikrotiterplatte zur Gewährleistung direkter Bindung von Haptenen.

Beschichtungsmoleküle	Vorbehandlung der Platte	Literatur
Human Immunodeficiency Virus (HIV) – Peptide	UV-Bestrahlung; Präinkubation mit Poly-L-Lysin; Präinkubation mit Glutaraldehyd	Boudet <i>et al.</i> , 1991
synthetische HIV-Peptide	Alcian Blue	Lagace <i>et al.</i> , 1994
Tobramycin (Aminoglycosid)	Alcian Blue	Sachetelli <i>et al.</i> , 1998
4,4-Bis (4-hydroxyphenyl) valeriansäure	Modifikation durch 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES)	Feng <i>et al.</i> , 2009
Atrazin; 2,4- Dichlorphenoxyessigsäure	Modifikation durch 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES)	Kaur <i>et al.</i> , 2008; Kaur, 2004
Amino chloramphenicol	Präinkubation mit Glutaraldehyd	Sai <i>et al.</i> , 2010
Verschiedene Triazine	Präinkubation mit Glutaraldehyd	Holthues <i>et al.</i> , 2005

Jedoch ist es auch möglich, die Platten ohne jegliche Vorbehandlung mit Haptenen zu beschichten. Hofstetter *et al.* (1997) konnten eine stabile direkte Beschichtung von *p*-Amino-D-phenylalanin (Molekularmasse = 180) bei Maxisorp (Nunc, Wiesbaden, Germany) und bei High Affinity (Greiner, Nürtingen, Germany) Mikrotiterplatten erreichen. Sie wiesen nach, dass die Bindung von Haptenen auf Mikrotiterplatten von den Platteneigenschaften, wie z. B. der Polarität oder nach  $\gamma$ -Bestrahlung, abhing. Falls bei den Haptenen geeignete funktionelle Gruppen vorlagen, konnte eine Beschichtung auf passende Mikrotiterplatten ohne vorherige

Behandlung oder Modifikation erfolgen. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Striatal B verfügt über  $-OH$ ,  $-COCH_3$ ,  $-CHO$  und  $-C=O$  Gruppen, die eine direkte Bindung des Striatal B auf der Platte gewährleisten. Die höchsten spezifischen Signale wurden bei einer direkten Beschichtung von Striatal B auf Maxisorp Platten erzielt (Abbildung 2.48).

Neben dem geeigneten Plattenmaterial spielt der pH-Wert des Beschichtungspuffers für die Beschichtungseffizienz eine bedeutende Rolle (Geerligs *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 2003; Güll *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). Wie in Abbildung 2.47 dargestellt, wurden deutliche Unterschiede zwischen den drei pH-Werten festgestellt. Als bester Beschichtungspuffer erwies sich der PBS-Puffer, da hier die beste konzentrationsabhängige Kurvenform erzielt wurde. Mittels HPLC-DAD konnte nachgewiesen werden, dass die Stabilität bzw. Löslichkeit von Striatal B stark von dem verwendeten Beschichtungspuffer bzw. vom pH-Wert abhängt (Abbildung 2.46). Die höchste Löslichkeit von Striatal B wurde in einem Puffer mit pH 4,0 nachgewiesen. Jedoch wurde ein Abbau von ca. 40% Striatal B nach 11 h beobachtet. Im Puffer mit pH 7,4 und pH 9,5 wurden sehr geringe Mengen an Striatal B nachgewiesen, da die Löslichkeit unter diesen pH-Bedingungen sehr gering ist. Trotzdem ist sie immer noch größer als die zur Beschichtung erforderliche Konzentration. Es ist zu vermuten, dass die niedrigen spezifischen Signale bei Verwendung des Kaliumacetatpuffers mit pH 4,0 durch die Instabilität bzw. den Abbau von Striatal B bedingt wurden. Die Ionenstärke könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Beschichtung der Platte haben (Liu *et al.*, 2009; Wortberg *et al.*, 1996a; Li *et al.*, 2009). Ob dies die Beschichtungseffizienz von Striatal B erhöhen kann, muss in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

Wie bereits in der Literatur beschrieben (Hardy *et al.*, 1994; Firer *et al.*, 1991; Mushens und Scott, 1990; Zhang *et al.*, 2012), muss bei der Beschichtung auch ein Temperatur- und Zeitfaktor in Betracht gezogen werden. Im Vergleich zu 4 °C wurden bei 24 °C und 37 °C höhere spezifische Signale gegen Striatal B nachgewiesen (Abbildung 2.49). D. h., die höheren Temperaturen beschleunigten die Bindungsgeschwindigkeit und erhöhten die Beschichtungseffizienz. Weiterhin erzeugte eine Beschichtung über Nacht deutlich bessere spezifische Signale als eine Beschichtung von zwei Stunden (Abbildung 2.50).

Bei der Überprüfung der Lagerstabilität (Abbildung 2.53) wurde eine Abnahme der spezifischen Signale ( $\Delta$ Extinktion  $\sim 0,2$ ) bereits nach 2 Tagen bei 4 °C festgestellt. Danach wurde keine merkliche Abnahme mehr verzeichnet. Die Abnahme der spezifischen Signale lag innerhalb eines tolerierbaren Bereiches, sodass eine Verwendung von 16 Tage alten, beschichteten und blockierten Mikrotiterplatten möglich war. Tagesabhängige Unterschiede könnten durch viele Faktoren erklärt werden, z. B. durch die Variabilität beim Ansetzen der Reagenzien und Lösungen, durch die Temperatur des Puffers oder durch die Variabilität beim Waschen der Platten (Whittington, 1992; Tothiam *et al.*, 2011).

Möglicherweise lässt sich eine Signalabnahme während der ersten zwei Tage durch Additive vermeiden. Kolosova *et al.* (2006) beschrieben ebenfalls eine starke Abnahme der spezifischen Signale innerhalb weniger Tage. Allerdings gelang es ihnen, durch einen Zusatz von Additiven, wie z. B. Trehalose, Glycin, Polyvinylalkohol oder BSA, den Stabilitätsverlust weitgehend zu minimieren. Auch Dankwardt *et al.* (1998) wiesen darauf hin, dass die Anwendung von Zuckern, Polymeren, BSA oder kommerziell erhältlichen Stabilisierungslösungen die Lagerfähigkeit der beschichteten Platten verlängerte.

### ***Einflussfaktoren bei der Blockierung***

Unter Blockierung versteht man die Absättigung freier Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte nach der Beschichtung. Ohne Blockierung würden die Assay-Antikörper oder auch Probenbestandteile an die Oberfläche binden, was zu einem falschen Ergebnis oder einem hohen Hintergrundsignal führen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Blockierung mit 5%igem Milchpulver ein wesentlich höheres Hintergrundrauschen und eine schlechtere Konzentrationsabhängigkeit festgestellt (Abbildung 2.51). Es könnte sein, dass die primären Antikörper unspezifisch an das Milchpulver binden und dadurch ein höheres Signal ergeben. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass von dem Milchpulver eine sterische Hinderung ausgeht, und die primären Antikörper somit nicht an Striatal B binden können. Diese Annahme wird durch Mohammad und Esen (1989) unterstützt. Diese Autoren beschrieben ebenfalls, dass die Zugänglichkeit der

Antikörper an die Antigenepitope durch Milchpulver reduziert wurde. Die sterische Hinderung durch Proteine im Milchpulver könnte dafür verantwortlich sein. Alternativ könnten einige Milchproteine die Epitope der Antigene abschirmen, so dass die Antigen-Antikörper-Reaktion verhindert wird.

### ***Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln***

Um eine bessere Löslichkeit der Cyathan-Diterpenoide zu erreichen, wurden dem Präinkubationspuffer (PBST) organische Lösungsmittel, z. B. DMSO, Acetonitril oder Methanol, zugesetzt. Es ist bekannt, dass organische Lösungsmittel den Assay beeinflussen können. In der Literatur ist beschrieben, dass Methanol den geringsten negativen Einfluss hervorruft und die Anwendung von kleinen Volumina Acetonitril oder DMSO toleriert wird (Tabelle 3.5). Kim *et al.* (2003) beschrieben, dass die spezifischen Signale abnehmen, wenn der Anteil von Acetonitril oder von Aceton stieg. Ab einem Anteil von 25% war eine plötzliche Steigerung der Signale zu beobachten. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in dieser Arbeit gemacht (Abbildung 2.54). Bei der Anwendung von Acetonitril > 25% bzw. DMSO > 40% wurde eine signifikante Steigerung der Signale registriert. Die Autoren haben vermutet, dass die beiden Lösungsmittel bis zu einer bestimmten Konzentration die Antigen-Antikörper-Bindung unterdrückten und ab dieser Konzentration die Antigen-Antikörper-Bindung wieder förderten. Es könnte aber auch eine Denaturierung der primären Antikörper stattgefunden haben. In diesem Fall würden sie ihre Spezifität verlieren und unspezifisch an die Blockierungsproteine binden. Dies würde nicht zu der von den Autoren vermuteten Reaktionsförderung, sondern zu falsch-positiven Signalen führen.

Tabelle 3.5: Beispiele zu Anwendungstoleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln im ELISA.

Literatur	Toleranzbereich
Brun <i>et al.</i> , 2004	Aceton, 4%; Acetonitril, 4%; Isopropanol, 1%; Methanol, 10%; DMSO, 4%
Kim <i>et al.</i> , 2003	Aceton, 5%; Acetonitril, 5%; Methanol, 15%
Sathe <i>et al.</i> , 2011	Methanol, 10%
Zeng <i>et al.</i> , 2007	Methanol, 30%
Liu <i>et al.</i> , 2009	Aceton, 0%; Acetonitril, 0%; Methanol, 5%
Mercader <i>et al.</i> , 2013	Acetonitril, 3%; Ethanol, 10%; Methanol, 20%
Vorliegende Arbeit	Acetonitril, 10%; DMSO, 10%; Methanol, 25%

### **Spezifität / Kreuzreaktivität**

Zur Untersuchung der Spezifität der primären Antikörper wurden Kreuzreaktivitäten von mit Striatal B strukturverwandten Substanzen bestimmt (Tabelle 2.11). Alle getesteten Substanzen (Striatal A, C und D, Striatin A und B, und Erinacin C und P) wiesen Kreuzreaktivitäten gegen Striatal B auf. Die höchste Kreuzreaktivität zeigte Striatin B (109,3%), die niedrigste Erinacin P mit lediglich 21,1%. Vergleicht man die Struktur von Striatal B mit Striatin B (Abbildung 3.3), so ist es gut nachvollziehbar, dass beide stark um die Antikörper konkurrieren. Beide Verbindungen unterscheiden sich lediglich in der Aldehydgruppe am C<sub>7</sub>-Ring im Cyathan-Grundgerüst. Diese Stelle wurde bei der Synthese des Hapten-BSA-Konjugats genutzt, um die Immunisierungsantigene herzustellen. D.h., die primären Antikörper müssten gegen die restlichen Seitengruppen des Striatal B gerichtet sein. Demzufolge sollten Striatal B und Striatin B die gleichen antigenen Determinanten (Epitope) aufweisen.

Vergleicht man die Struktur von Striatal B mit Erinacin P (Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4), so lässt sich vermuten, dass die Kreuzreaktivität von Erinacin P gegen Striatal B hauptsächlich durch das Cyathan-Ringsystem hervorgerufen



wurde. Dies bedeutet, dass das Cyathan-Grundgerüst eines der Epitope ist, die eine spezifische Affinität zu den produzierten Antikörpern aufweisen.

### **Analyse biologischer Proben**

Bei der Anwendung des ELISA auf biologische Proben, nämlich Kulturüberstände und Rohextrakte aus Kulturüberständen von *H. erinaceus*, waren über den Kulturverlauf hinweg deutliche Unterschiede erkennbar (Abbildung 2.57 und Abbildung 2.58). Ein starker Matrixeffekt wurde bei der direkten Analyse des Kulturmediums ohne Pilz beobachtet, da der % B/B<sub>0</sub>-Wert hier bereits 76% betrug, obwohl im Kulturmedium keine Cyathan-Diterpenoide vorlagen. Die Analyse des mit Ethylacetat extrahierten Kulturmediums ohne Pilz ergab allerdings einen % B/B<sub>0</sub>-Wert von nahe 100%, was auf störende Bestandteile im nicht-extrahierten Medium hinwies. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse aus den Rohextrakten aussagekräftiger.

In Abbildung 2.58 ist ein minimaler % B/B<sub>0</sub>-Wert am Tag 3 zu erkennen, was damit zusammenhängt, dass am Tag 3 die höchste Konzentration von Erinacin P mittels HPLC-DAD und HPTLC gemessen wurde (Abbildung 2.16 und Abbildung 2.17). Ab Tag 4 wurde Erinacin C langsam akkumuliert, womit ein weiteres Sinken des %B/B<sub>0</sub>-Wertes einherging.

Mit Hilfe einer Kalibrierreihe des Striatal B-Standards sollte die Produktkonzentration in der Submerskultur abgeschätzt werden können (Abbildung 2.59). Jedoch ist zu erkennen, dass die über ELISA ermittelten Werte wesentlich niedriger ausfallen als die über HPLC-DAD erhaltenen Werte (Abbildung 2.16). Ein möglicher Grund dafür könnte die unterschiedliche Kreuzreaktivität verschiedener Sekundärmetabolite im Rohextrakt sein. Im Rohextrakt aus der Submerskultur von *H. erinaceus* lag eine Mischung von Erinacin C und P vor, die beide unterschiedlich stark mit den primären Antikörpern kreuzreagierten. Mit dem ELISA ließ sich nur die gesamte Konzentration aller Erinacine bestimmen. Die Bestimmung der Konzentration einzelner Substanz war nicht möglich. Erst durch Einsatz eines Antikörper-Arrays (verschiedene spezifische Antikörper, die gegen die einzelnen Substanzen gerichtet sind) und eine statistische Datenanalyse ergibt

sich die Möglichkeit, dieses Problem zu lösen (Jones *et al.*, 1996; Wortberg *et al.*, 1996b; Samsonova *et al.*, 1999; Bhand *et al.*, 2005).

Die Abnahme der Produktkonzentration beim ELISA am Kulturtag 8 könnte eventuell durch den Prozone-Effekt (auch „*hook effect*“ genannt) erklärt werden. Dieser Effekt tritt dann auf, wenn in einer Probe zu viele Antigene enthalten sind. Diese konkurrieren dann um die begrenzten Bindungsstellen des Antikörpers. Ein Überangebot an Antigenen führt dann zu keiner korrekten Antigen-Antikörper-Reaktion und damit zu einem falsch negativen Signal. Dieser Effekt wird häufig bei klinischen Immunassays beobachtet (Dodig, 2009; Smith und Holman, 2004; Jury *et al.*, 1990) und als Prozone-Effekt bezeichnet. Da eine steigende Konzentration von Erinacin C am Kulturtag 8 mittels HPLC-DAD nachgewiesen wurde, aber diese mit dem ELISA nicht bestätigt werden konnte, könnte auch hier ein Prozone-Effekt vorliegen. Offenbar wurden bei der Präinkubation zu wenig Antikörper vom Antigen des Extraktes gebunden, so dass dieser primäre Antikörper dann direkt an das Striatal B der Platte gebunden hat. Daraus resultierte ein höheres Signal als erwartet, was über einen höheren %B/B<sub>0</sub>-Wert letztendlich zu einer niedrigeren Konzentration führte. Hier hätte ein Verdünnen der Probe Abhilfe schaffen können (Liu *et al.*, 2012b). Dabei muss die Probe so stark verdünnt werden, dass das resultierende Signal noch innerhalb des Linearbereichs der Kalibrierkurve liegt.

Im Rohextrakt aus Fruchtkörpern von *H. erinaceus* wurde keine signifikante Konkurrenz gegen Striatal B beobachtet, da alle %B/B<sub>0</sub>-Werte der getesteten Konzentrationen nahe 100% lagen (Abbildung 2.60). D. h. in den Fruchtkörpern lagen wahrscheinlich keine Cyathan-Diterpenoide oder nur Spuren davon (< Nachweisgrenze des ELISA) vor. Bislang wurde nur über das Vorkommen von Hericenonen, Hericerinen und Erinacerinen im Fruchtkörper von *H. erinaceus* berichtet (Ma *et al.*, 2010). Hericenon B und Hericerin wurden in der vorliegenden Arbeit mittels präparativer HPLC aus den Fruchtkörpern isoliert (2.2.2.2). Aufgrund der Struktur dieser Substanzen ist davon auszugehen, dass sie keine Kreuzreaktivität gegen Striatal B aufweisen.

### **Applikationspotential**

Versuche zur Wiederfindung (2.4.8.4) haben gezeigt, dass der hier entwickelte ELISA 20-fach sensitiver als die HPLC-DAD-Methode war und eine ausreichende Genauigkeit aufwies. Auch Liu *et al.* (2009) und Sachetelli *et al.* (1998) stellten fest, dass ihr ELISA wesentlich sensitiver als die HPLC war. Eine 1000-fach höhere Sensitivität des ELISA im Vergleich zur HPLC berichteten Tothiam *et al.* (2011) bei der Untersuchung von Bacoside A<sub>3</sub>, da sie monoklonale Antikörper verwendeten, die wesentlich sensitiver als polyklonale Antikörper sind. Mit der hohen Sensitivität und der Toleranz bei der Anwendung von organischen Lösungsmitteln erlaubt der ELISA eine direkte Analyse der durch organische Lösungsmittel extrahierten biologischen Probe. Somit bietet der ELISA die Möglichkeit einer Screeningmethode, mit der man Substanzen aus der Klasse der Cyathan-Diterpenoide aus Rohextrakten einfach detektieren kann. Damit lassen sich neue Produzenten dieser Stoffklasse entdecken.

Darüber hinaus ist es mit dieser Screeningmethode möglich, durch die Kombination von präparativer HPLC und ELISA einzelne Fraktionen auf Kreuzreaktivitäten zu überprüfen. So haben Tanaka und Shoyama (1998) z. B. die Cannabinoide aus Biotransformationsprodukten von *Pinellia ternata* identifiziert.

## **3.7 Sekundärmetabolite aus *H. erinaceus***

In der vorliegenden Arbeit wurde mit 4-Chlor-3,5-dimethoxybenzaldehyd eine halogenierte Substanz mittels GC-MS gefunden. Diese Substanz wurde von Okamoto *et al.* (1993) bereits beschrieben. Sie besitzt eine antimikrobielle Aktivität gegen *Bacillus subtilis* und eine inhibitorische Aktivität auf das Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae*, *Verticillium dahliae* und *Aspergillus niger*. Ueda *et al.* (2009) berichteten über eine protektive Wirkung dieser Substanz gegen stressabhängigen Zelltod. 4-Chlor-3,5-dimethoxybenzoesäure wurde mittels präparativer HPLC isoliert und identifiziert (Abbildung 2.13). Diese Substanz wurde bisher als Sekundärmetabolit aus *H. erinaceus* noch nicht in der Literatur

beschrieben. Ob sie über ähnliche biologische Wirkungen wie die bekannte Verbindung 4-Chlor-3,5-dimethoxybenzaldehyd verfügt, muss weiter untersucht werden.

Sowohl aus Submerskulturen, als auch aus Fruchtkörpern wurden stickstoffhaltige Verbindungen identifiziert (Tabelle 2.3 bis Tabelle 2.5). Alle Verbindungen weisen eine Isoindoleinheit auf, die mit unterschiedlichen Seitenketten modifiziert sind. Die Bildung der Isoindoleinheit von *H. erinaceus* ist daher von der Kulturform (Submerskultur vs. Fruchtkörper) unabhängig. Zur Aufklärung der Biosynthese solcher Verbindungen sowie der biologischen Aktivitäten sind weitere Untersuchungen erforderlich.

### **3.8 Molekularphylogenetische Charakterisierung von *H. erinaceus***

Mit Hilfe der ITS-Sequenzen wurden die verwendeten Fruchtkörper von *H. erinaceus* sowie der Stamm FU70034 mit einer Homologie von 99% bzw. 94~95% zu verschiedenen *H. erinaceus*-Stämmen charakterisiert (Tabelle 2.15 und Tabelle 2.16). Lu *et al.* (2002) berichteten eine Homologie der verschiedenen ITS-Sequenzen von *H. abietis*, *H. americanum*, *H. coralloides* und *H. erinaceus* von > 98%. Auch Hallenberg *et al.* (2013) beschrieben, dass die *Hericium* sp., wie z. B. *H. alpestre*, *H. americanum* und *H. erinaceus* sehr ähnlich unter dem Mikroskop aussahen und sie allein durch ITS-Sequenzen nicht differenziert werden konnten. Die Pilzartgrenzen waren nicht immer klar und viele Sammlungen wurden unter falschen Namen eingeordnet. Zur sichereren Identifizierung eines *Hericium*-Stamms sollten makromorphologische Eigenschaften, geographische Herkunft sowie Substratvorlieben mit berücksichtigt werden. *H. erinaceus* wächst bevorzugt auf Laubbäumen wie Eichen, während *H. americanum* vorwiegend auf Hartholz wächst und meistens in Nordamerika zu finden ist.

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Mikroorganismen

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Pilze untersucht (Tabelle 4.1). Die Stämme wurden vom Projektpartner IMD zur Verfügung gestellt. Die Fruchtkörper wurden bei [www.pilzgarten.de](http://www.pilzgarten.de) bestellt.

Tabelle 4.1: Untersuchte Basidiomyceten.

Stamm	Herkunft
<i>Cyathus striatus</i> (FU04405)	IMD Private Stammsammlung von Marc Stadler in Wuppertal, Deutschland, 1996
<i>Hericium erinaceus</i> (FU70034)	IMD (aus Pilzzucht CBS 106506) Stammsammlung von Nils Hallenberg in Krasnodar, Russland, 1991
<i>Hericium erinaceus</i> (Fruchtkörper)	<a href="http://www.pilzgarten.de">www.pilzgarten.de</a>

### 4.2 Chemikalien

Tabelle 4.2: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Aceton	reinst Ph. Eur., NF	Applichem (Darmstadt)
Acetonitril	Chromasolv, für die HPLC, Gradient Gr.	Sigma (Taufkirchen)
Adenosin-5'-triphosphat, di-Natriumsalz	≥ 98%	Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar Kobe I	Kobe I, pulv.	Roth
Agarose LE		Biozym (Hessisch Oldendorf)

---

Albumin Fraktion V aus Rinderserum (BSA)	98%	Roth
Aluminiumchlorid	98% reagent grade	Sigma
Ammoniumsulfat	≥ 99,5%, p.a., ACS, ISO	Roth
Anilin	puriss p.a.	Sigma
L-Asparagin-Monohydrat	BioChemica	Applichem
Calciumcarbonat	Pulver, 99% A.C.S. rein	Sigma
Calciumchlorid-dihydrat	p.a.	Applichem
Carboxymethylcellulose		Sigma
2-Chlor-4,5- dimethoxybenzaldehyde	95%	ABCR GmbH (Karlsruhe)
Chloroform-d <sub>4</sub>	99,8 atom% D, stabilisiert mit Silberfolie, für NMR	Acros Organics (Geel, Belgien)
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	> 98%, lyophilisiert	Roth
Dichlormethan	min. 99,5%, Ph.Eur., reinst	Roth
Diethylether	ROTIPURAN®, min. 99,5%, p.a.	Roth
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	98%	Fluka
Dikaliumhydrogenphosphat	wasserfrei, p.a.	Applichem
Dimethylsulfoxid	ROTIPURAN®, min. 99,8%, p.a.	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat- dihydrat	zur Analyse, p.a.	Applichem
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)		Sigma
Diphenylamin (DPA)	puriss p.a.	Sigma
Diphenylborsäure-2- aminoethylester	≥ 98% p.a.	Roth
Echtblausalz B	95%	Sigma

---

Edamin® K (Lactalbumin Enzymatic Hydrolysate)		Sigma
Edamin® S (Lactalbumin Enzymatic Hydrolysate)		Humko Sheffield (Memphis, USA)
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	zur Analyse, p.a.	Applichem
Essigsäure	ROTIPURAN®, 100%, p.a.	Roth
Essigsäureethylester	≥ 99,5%, Ph.Eur, reinst	Roth
Ethanolamin	ACS, 99+%	Alfa Aesar (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	1%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA)	≥ 99,0%, BioUltra	Applichem
D-Fructose	≥ 99,5%	Roth
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase		Fluka (Neu-Ulm)
D(+)-Glucose-Monohydrat	f. d. Mikrobiologie	Roth
Hafermehl		Dr. Oetker (Düsseldorf)
Hefeextrakt	p.a.	OXOID Limited (Wesel)
n-Hexan	Hipersolv Chromanorm für HPLC	VWR (Darmstadt)
Hexokinase		Sigma
Kaliumacetat	reinst Ph. Eur.	Applichem
Kaliumchlorid	reinst Ph. Eur., USP	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99%, p.a. ACS	Roth
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	zur Analyse, p.a.	Applichem
Lactose-Monohydrat	Ph. Eur., DAB	Roth
Magnesiumsulfat	getrocknet, reinst, DAC	Roth
D(+)-Maltose-Monohydrat	≥ 95%, für die Biochemie	Roth
Malzextrakt	für die Mikrobiologie	Fluka
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	zur Analyse, p. a.	Applichem

---

D-Mannitol	≥ 98%	Sigma
Melasse		Südzucker (Mannheim)
Methanol	für HPLC Gradient Grade	Fischer Scientific (Schwerte)
Methanol	≥ 99,5%, Ph. Eur., reinst	Roth
Methanol-d <sub>4</sub>	≥ 99,8%	Deutero (Kastellaum)
Milchpulver	Blotting grade	Roth
Natriumacetat	wasserfrei, p.a.	Applichem
Natriumcarbonat	≥ 99%, wasserfrei	Roth
Natriumchlorid	reinst Ph. Eur., USP	Applichem
Natriumhydrogencarbonat	≥ 99,5%, p.a., ACS, ISO	Roth
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	p.a.	Applichem
Natriumhydroxid	p.a.	Applichem
Natriumsulfat	wasserfrei, ≥ 99%	Roth
Ninhydrin	GR for Analysis	Merck (Darmstadt)
ortho-Phosphorsäure	p.a., 85-90%, für die HPLC	Fluka
ortho-Phosphorsäure	85%, reinst	Roth
n-Pentan	min. 99%	Fisher Scientific
Pepton aus Soja	für die Mikrobiologie	Roth
Polyethylenglykol (PEG)	p.a.	J.T.Baker (Deventer, Niederlande)
Primulin	50%	Sigma
2-Propanol	Hipersolv Chromanorm für HPLC	VWR
Roti <sup>®</sup> -Nanoquant (5x-Konz.)		Roth
D(+)-Saccharose	≥ 99,5%, p.a.	Roth
Salzsäure	rauchend 37% ROTIPURAN <sup>®</sup> p.a., ACS, ISO	Roth

---



---

Schwefelsäure	95-98%, ROTIPURAN® p.a., ISO, max. 0,005 ppm Hg	Roth
Stickstoff		Praxair (Düsseldorf)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	BioChemica	Applichem
Thymol	ROTICHRON GC, min. 96%	Roth
Trifluoressigsäure	für die HPLC	Acros (Nidderau)
Tris	PUFFERAN®, min. 99,3%, Buffer Grad	Roth
Tris-Hydrochlorid	PUFFERAN®, ≥ 99%	Roth
Tween 20	Ph. Eur.	Roth
Vitamin B <sub>1</sub> -Hydrochlorid	98,5%	Roth
Wasserstoffperoxid	stabilisiert, 30% p.a.	Roth
Weizenmehl	Type 405	Albert Mühlischlegel (Thannhausen)
D(+)-Xylose	> 99% für die Biochemie	Roth
Zink(II)-sulfat-Heptahydrat	p.a.	Applichem

---

## 4.3 Geräte und sonstige Hilfsmittel

Tabelle 4.3: Verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	LABOKLAV 160 MSL	SHP Steriltechnik AG (Magdeburg)
Autoklav	LABOKLAV 25 Basic	SHP Steriltechnik AG
Bioreaktor	Labfors 3, 7,5 Liter TV-NW150	Infors HAT (Bottmingen)
Brutschrank	INE 500	Memmert (Schwabach)
Eismaschine	AF 80 Scotsman	Frimont (Mailand, Italien)
Feuchtebestimmer	MA 35	Sartorius (Göttingen)
Flugzeitmassenspektrometer	MicroTOF	Bruker Daltonics® (Bremen)
Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID)	Agilent 7890A	Agilent Technologies (Santa Cruz USA)
Gaschromatograph mit massenselektivem Detektor (GC-MS)	Agilent 7890A	Agilent Technologies
Gefriertrocknungsanlage	ALPHA 1-2 LD plus	CHRiST® (Osterode am Harz)
Geldokumentation	DeVision G	Decon Science Tec (Hohengandern)
Gelelektrophoresekammer	PerfectBlue Mini S	Peqlab (Erlangen)
Grobwaage (d = 0,01 g)	Atilon Aculab	Sartorius Group
Handystepper	Handy Step®	Brand (Wertheim)
Heizbad	IKA® HB10 basic	IKA®-Werke GmbH (Staufen)
Konzentrator	SBHCONC/1	Stuart Sample (Staffordshire, UK)
Kühler	Minichiller	Huber (Offenburg)
Kühl-Thermo-Mixer	MKR 13	HLC BioTech (Bovenden)
Magnetrührer	IKA® RH basic 2	IKA®-Werke GmbH

Massenspektrometer	LTQ FT Ultra	Thermo Scientific (Bremen)
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research pro 50-1200 mL	Eppendorf (Hamburg)
Mikroskop	Olympus BX-40	Olympus Europa (Hamburg)
NanoPhotometer™	Pearl	Implen (München)
PCR-Cycler	Mastercycler personal	Eppendorf
PCR-Werkbank	PCR-Workstation	Peqlab
pH-Meter	Seven Easy	Mettler Toledo GmbH (Schweiz)
Plattenreader	Synergy 2	BioTek (Winooski, USA)
Präzisionswaage (d = 0,01 mg)	BP211D	Sartorius
Pürierstab		Philips (Amsterdam, NL)
Pyrolyseofen	HCE 8544.0	Bosch (München)
Reagenzglasnischer	VTX-3000L, Mixer UZUSIO	Laboratory & Medical Supplies, LMS Group (Japan)
Reinstwasseranlage	arium® 611 VF	Sartorius
Rotationsverdampfer	IKA® RV10 basic	IKA®-Werke GmbH
Rührwerkskugelmühle	DYNO®-MILL Research LAB	Wiley A. Bachofen AG (Muttens, CH)
Schüttler	Multitron	Infors AG (Einsbach)
Schüttler	Minitron	Infors AG
Software Spektralphotometer	WinASPECT 2.2.1.0	Analytik Jena (Jena)
SpeedVac	Christ Alpha RVC 2	Martin Christ GmbH (Osterode am Harz)
Spektralphotometer	Specord 50	Analytik Jena
Sterilbank	HERA safe KS18	Thermo Scientific (Karlsruhe)
Tischzentrifuge	Microfuge® 22R	BECKMAN COULTER™ (Krefeld)
Tischzentrifuge	Allegra® X-15R	BECKMAN COULTER™
Trockenschrank	Heraeus T6	Thermo Scientific

Ultraschallbad	Elma T710DH	OMNILAB (Bremen)
Ultra-Turrax	IKA® T18 basic	IKA®-Werke GmbH
Umwälzkühler	Minichiller	Huber (Offenburg)
UV-A Lampe	Cleo Compact, 20 W SLV-Lampen	Philips
UV-Transilluminator	MD-20, 312 nm	Wealtec Corp. (Sparks, USA)
Vakuum-Controller	CVC 3000	Vacuubrand for VWR (Wertheim)
Vakuumpumpe	RV10 basic	IKA®-Werke GmbH
Agilent LC-MS (bei IMD)		
LC-System	Agilent 1100 series	Agilent Technologies
ELSD	SEDEX 85	Sedere (Alfortville, Frankreich)
MS	Micromass LCT	Waters (Eschborn)
Camag HPTLC		
Autosampler	Automatic TLC Sample 4	Camag (Muttensz, CH)
Dokumentation	BioLuminizer™	Camag
	TLC Visualizer	Camag
Heizplatte	TLC Plate Heater	Camag
HPTLC-Platte	Silicagel 60 F254	Merck (Darmstadt)
Interface	TLC-MS Interface	Camag
Laufkammer	Twin Through Chamber	Camag
Scanner	TLC Scanner 4	Camag
Software	WinCats RePROSTAR 3	Camag

Tauchgerät	Chromatogramm Immersion Device	Camag
Massenspektrometer	expression CMS	Advion (NY, USA)
Jasco HPLC		
Interface	LC-Net II /ADC	Jasco (Gross-Umstadt)
3-Line Degasser	DG-2080-53	Jasco
Pumpe	PU-2080 Plus	Jasco
Ternary Gradient Unit	LG-2080-02S	Jasco
UV/Vis Detektor	UV-2075 Plus	Jasco
MERCK HPLC		
Autosampler	L-7200	MERCK HITACHI (Darmstadt)
DAD	L-7455	MERCK HITACHI
Interface	D-7000	MERCK HITACHI
Pumpe	L-7100	MERCK HITACHI
Präparative HPLC 1 (für <i>C. striatus</i> und <i>H. erinaceus</i> )		
Fraktionssammler	CHF 122SC Fraction collector	Advantec (Osaka, Japan)
Quaternary Pump	YL 9110S	Young Lin Instrument Co. (Hongye Anyang, Korea)
UV/Vis-Detektor	YL 9120S	Young Lin Instrument Co.
Präparative HPLC 2 (für <i>C. striatus</i> )		
Degasser	Module 806	Gilson (Middleton, USA)
Dynamischer Mixer	811C	Gilson
Fraktionskontrolller	Modell 201-202	Gilson

Fraktionssammler	Modell 202	Gilson
Pumpe	Modell 306	Gilson
System Interface	506C	Gilson
UV/Vis-Detektor	Modell 155	Gilson

Präparative HPLC 3 (für *H. erinaceus* bei IMD)

Degasser	Module 806	Gilson
Dynamischer Mixer	811C	Gilson
Fraktionskontroller	Modell 201-202	Gilson
Fraktionssammler	Modell 204	Gilson
Pumpe	Modell 306	Gilson
System Interface	506C	Gilson
DAD	Modell 170	Gilson

## MALDI-Imaging

Kryotom	HM525 cryostat	Thermo Scientific
MALDI-MS	Q Exactive	Thermo Fischer
Mikroskop	BX-40	Olympus Europa (Hamburg)
Stickstoff-Laser	LTB MNL-100	LTB (Berlin)
Software	Mirion	AG Spengler

---

Tabelle 4.4: Verwendete Trennsäulen.

Nr.	Säule	Hersteller
1	Inertsil ODS-3, C <sub>18</sub> , 250 x 30 mm	GL Sciences Inc. (Tokyo, Japan)
2	Kromasil 100 C <sub>18</sub> , 7 µm, 250 x 20 mm	MZ Analysentechnik (Mainz)
3	Kromasil 100 C <sub>8</sub> , 7 µm, 250 x 40 mm	MZ
4	Nucleosil® C <sub>18</sub> , 100-5, 125 x 3 mm	Macherey Nagel (Düren)
5	Vorsäule Kromasil 50x20 mm, 100 C <sub>18</sub> , 7 µm	MZ
6	Vorsäule Kromasil 50x20 mm, 100 C <sub>8</sub> , 7 µm	MZ
7	Vorsäule Nucleosil® C <sub>18</sub> , 100-5, 8 x 3 mm	Macherey Nagel
8	Waters symmetry C <sub>18</sub> , 150 x 2,1 mm, 3,5 µm	Waters (Eschborn)

## 4.4 Kultivierung von Basidiomyceten

### 4.4.1 Nährmedienzusammensetzung

Tabelle 4.5: Standardnährlösung (SNL) modifiziert nach Sprecher und Hanssen (1982).

Komponente	Konzentration
D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g L <sup>-1</sup>
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g L <sup>-1</sup>
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L <sup>-1</sup>
Magnesiumsulfat	0,5 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	3,0 g L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung (Tabelle 4.12)	1,0 mL L <sup>-1</sup>
dest. Wasser	ad 1000 mL

Bei der Herstellung von SNL-Agar wurden 20,0 g L<sup>-1</sup> Agar-Agar zugesetzt. pH-Einstellung auf 6,0 mit 1 M NaOH. Autoklavieren (121 °C, 20 min).

Tabelle 4.6: Malzextrakt-Agar.

Komponente	Konzentration
Malzextrakt	20,0 g L <sup>-1</sup>
Agar-Agar	15,0 g L <sup>-1</sup>
dest. Wasser	ad 1000 mL

Autoklavieren (121 °C, 20 min).



Tabelle 4.7: Hefemalz-Medium (YM6,3).

Komponente	Konzentration
D(+)-Glucose-Monohydrat	4,0 g L <sup>-1</sup>
Malzextrakt	10,0 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	4,0 g L <sup>-1</sup>
dest. Wasser	ad 1000 mL

Bei der Herstellung von YM6,3-Agar wurden 20,0 g L<sup>-1</sup> Agar-Agar zugesetzt. pH-Einstellung auf 6,3 mit 1 M HCl. Autoklavieren (121 °C, 20 min).

Tabelle 4.8: Sojapepton-Nährlösung (SP).

Komponente	Konzentration
D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g L <sup>-1</sup>
Pepton aus Soja	6,0 g L <sup>-1</sup>
Kaliumdihydrogenphosphat	2,5 g L <sup>-1</sup>
Magnesiumsulfat	0,5 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	1,5 g L <sup>-1</sup>
Calciumchlorid Dihydrat	73,5 mg L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung	1,0 mL L <sup>-1</sup>
dest. Wasser	ad 1000 mL

pH-Einstellung auf 6,0 mit 1 M NaOH. Autoklavieren (121 °C, 20 min).

Tabelle 4.9: Medienscreening zur Produktion von Erinacin C.

Gang <i>et al.</i> , 2008	[g L <sup>-1</sup> ]	Saito <i>et al.</i> , 1998	[g L <sup>-1</sup> ]
Maltose	20	Glucose	20,0
Hefeextrakt	2	Maltose	2,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	Weizenmehl	20,0
MgSO <sub>4</sub>	0,5	Malzextrakt	20,0
Vitamin B <sub>1</sub> -Hydrochlorid	0,001	Hefeextrakt	1,8
pH = 7,0		pH = 5,4~5,6	

Autoklavieren (121 °C, 20 min).

Tabelle 4.10: ZM1/2-Medium mit Edamin® S (Medium 0).

Komponente	Konzentration
<b>Wasserlösliche Komponenten</b>	
Melasse	5 g L <sup>-1</sup>
D(+)-Glucose-Monohydrat	1,5 g L <sup>-1</sup>
Saccharose	4 g L <sup>-1</sup>
Mannitol	4 g L <sup>-1</sup>
Ammoniumsulfat	0,5 g L <sup>-1</sup>
dest. Wasser	ad 1000 mL
<b>Wasserunlösliche Komponenten</b>	
Edamin® S	0,5 g L <sup>-1</sup>
Hafermehl	5 g L <sup>-1</sup>
Calciumcarbonat	1,5 g L <sup>-1</sup>

Autoklavieren (121 °C, 20 min). Die wasserunlöslichen Komponenten wurden separat in die jeweiligen Erlenmeyerkolben eingewogen und dann mit wasserlöslichen Komponenten aufgefüllt.

Tabelle 4.11: Medien für Weglassversuche.

Medium	0	1	2	3	4	5	6	7
Melasse	5	-	5	5	5	5	5	5
Hafermehl	5	5	-	5	5	5	5	-
D(+)-Glucose-Monohydrat	1,5	1,5	1,5	-	1,5	1,5	1,5	1,5
Saccharose	4	4	4	4	-	4	4	4
Mannitol	4	4	4	4	4	-	4	4
Edamin® S oder K	0,5 S	0,5 S	0,5 S	0,5 S	0,5 S	0,5 S	0,5 K	0,5 K
Ammoniumsulfat	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Calciumcarbonat	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Alle Angaben in g L<sup>-1</sup>. Autoklavieren (121 °C, 20 min).

Tabelle 4.12: Spurenelementlösung für Nährmedien.

Komponente	Konzentration
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	5 mg L <sup>-1</sup>
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	80 mg L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	30 mg L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	90 mg L <sup>-1</sup>
EDTA	400 mg L <sup>-1</sup>
dest. Wasser	ad 1000 mL

Steril filtrieren.

## 4.4.2 Kulturführung

### ***Stammhaltung***

Für die Stammhaltung wurden Agarplatten mit Basidiomyceten angeimpft. Als Medium diente dabei Flüssigmedium mit Zugabe von Agar-Agar (Tabelle 4.5, Tabelle 4.6 und Tabelle 4.7). Die Agarplatten wurden jeweils mit einem ca. 1 cm<sup>2</sup> großen, mit Mycel gut bewachsenen Agarstück beimpft und der Deckel mit Parafilm verschlossen. Nach unterschiedlich langen Wachstumsphasen im Brutschrank bei 24 °C wurden die Platten bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

### ***Inokulierung der Vorkultur***

Die Basidiomyceten wurden in verschiedenen Medien submers kultiviert. *C. striatus* wurde in SP-Medium (Tabelle 4.8) und *H. erinaceus* in YM6,3-Medium (Tabelle 4.7) inkubiert. Ein gut bewachsenes Agarstück (ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurde in einen 250 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL Nährmedium überführt. Danach wurden die Kulturen mit einem Ultra-Turrax für ca. 15 s mit  $10 \cdot 10^3 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$  homogenisiert und auf dem Schüttler bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss inkubiert. Nach einer Wachstumszeit von sieben Tagen dienten diese Kulturen nach erneutem Homogenisieren zum Animpfen der Hauptkulturen.

### ***Inokulierung der Hauptkultur***

#### Hauptkultur im Schüttelkolben:

Die Vorkulturen wurden mit einem Ultra-Turrax für ca. 15 s mit  $10 \cdot 10^3 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$  homogenisiert. Das Hauptkulturmedium (40% des gesamten Füllvolumens eines Erlenmeyerkolbens) wurde mit der entsprechenden Vorkultur inokuliert (1 mL Vorkultur pro 10 mL Hauptkulturmedium) und die Kolben auf dem Schüttler bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss kultiviert. Für *C. striatus* wurde SP-Medium (Tabelle 4.8) und für *H. erinaceus* das ZM1/2-Medium (Tabelle 4.10 und Tabelle 4.11) verwendet.

### Hauptkultur im Bioreaktor:

Für die Kultivierung von *C. striatus* im Bioreaktor wurden 4,5 L SP-Medium mit 500 mL homogenisierter Vorkultur inokuliert. Der Pilz wurde bei einer Temperatur von 24 °C, einer Rührgeschwindigkeit von 150 rpm und einer Begasung von 0,3 L min<sup>-1</sup> für 28 Tage kultiviert. Die gewonnene Biomasse wurde zur Untersuchung der Zellaufschlussmethoden verwendet.

### **Anzucht und Ernte von Biomasse**

Bei *H. erinaceus* wurde eine Steigerung der Biomassen- und Sekundärstoffbildung durch Belichtung der Submerskulturen mit UV-A-Bestrahlung überprüft. Um die Lichteffekte zu untersuchen, erfolgte die Kultivierung der Hauptkulturen während des Vorversuchs bei 24 °C und 150 rpm entweder mit UV-A-Bestrahlung in einem Rhythmus von 10 Stunden Licht und 14 Stunden Dunkelheit oder unter vollständigem Lichtausschluss.

Nach den Ergebnissen des Vorversuchs wurde beim Hauptversuch von *H. erinaceus* auf eine Belichtung der Kultur verzichtet.

Die Hauptkulturen wurden nach unterschiedlichen Kulturtagen abgebrochen. Zur Abtrennung des Mycels vom Kulturüberstand wurden die Kulturen über einen Büchnertrichter filtriert bzw. in ein Zentrifugenröhrchen (50 mL) überführt und bei 4 °C mit 4000 rpm, 2880 g für 10 min zentrifugiert. Falls die Kulturen nicht direkt weiter aufgearbeitet wurden, erfolgte eine Lagerung bei -20 °C.

### **Überprüfung auf Kontaminationen**

Durch Beobachtung des Kulturwachstums und des Aussehens des Mediums wurde routinemäßig auf eine Kontamination geprüft. Eine Kontamination durch Hefen und/oder Bakterien hätte zu einer Trübung des Kulturmediums geführt. Zusätzlich erfolgte eine mikroskopische Kontrolle.

## 4.5 Bestimmung der Kulturparameter

Um die Wachstumskinetik und die Wirkstoffproduktion zu verfolgen, erfolgte die Probenahme bei jedem Versuch in definierten Zeitabständen. Alle Ergebnisse resultierten mindestens aus einer Doppelbestimmung.

### 4.5.1 Biofeuchtmasse und Biotrockenmasse

#### ***Biofeuchtmasse (BFM)***

Die Mycelpellets wurden mittels Zentrifugation (4000 rpm, 2880 g, 4 °C, 10 min) vom Kulturüberstand abgetrennt. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und diente einerseits zur Bestimmung der Glucosekonzentration und andererseits zur Erfassung der Wirkstoffkonzentration im Kulturüberstand. Das Pellet wurde nach dreimaligem Waschen mit VE-Wasser in ein vorher gewogenes Zentrifugenröhrchen überführt und zur Bestimmung der Feuchtmasse ausgewogen (Formel 4.1).

$$BFM[g\ L^{-1}] = \frac{\text{ausgewogene Masse [g]}}{\text{Mediumvolumen [L]}} \quad \text{Formel 4.1}$$

#### ***Biotrockenmasse (BTM)***

Die BTM wurde mit Hilfe eines Feuchtebestimmers ermittelt. Der Feuchtanteil ( $F\%$ ) wurde in Prozent angegeben. Die BTM wurde mittels Formel 4.2 berechnet.

$$BTM[g\ L^{-1}] = \left(1 - \frac{F\%}{100}\right) \cdot BFM \quad \text{Formel 4.2}$$

### 4.5.2 pH-Wert

Der pH-Wert der Kulturmedien wurde unmittelbar nach den Probenahmen mit einem kalibrierten pH-Meter bestimmt.

### 4.5.3 Proteingehalt – photometrisch

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels der kommerziell erhältlichen Lösung Roti<sup>®</sup>-Nanoquant. Diese Methode stellt eine Abwandlung der Methode nach Bradford dar (Bradford, 1976). 200 µL Probe wurden mit 800 µL Arbeitslösung (1:5 Verdünnung von Roti<sup>®</sup>-Nanoquant 5x-Konzentrat mit Reinstwasser) versetzt, gemischt und 10 min inkubiert. Die Extinktionen wurden bei 590 nm und 450 nm gegen Wasser als Referenz bestimmt. Als Messwert diente der Quotient E590/E450. Als Kalibrierstandard wurde BSA Albumin Fraktion V verwendet. Die BSA-Standardlösungen wiesen einen Proteingehalt von 0-100 µg mL<sup>-1</sup> auf. Über die Regressionsgerade (Abbildung 4.1) lässt sich die Proteinkonzentration bestimmen. Bei einer Verdünnung der Probelösung wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

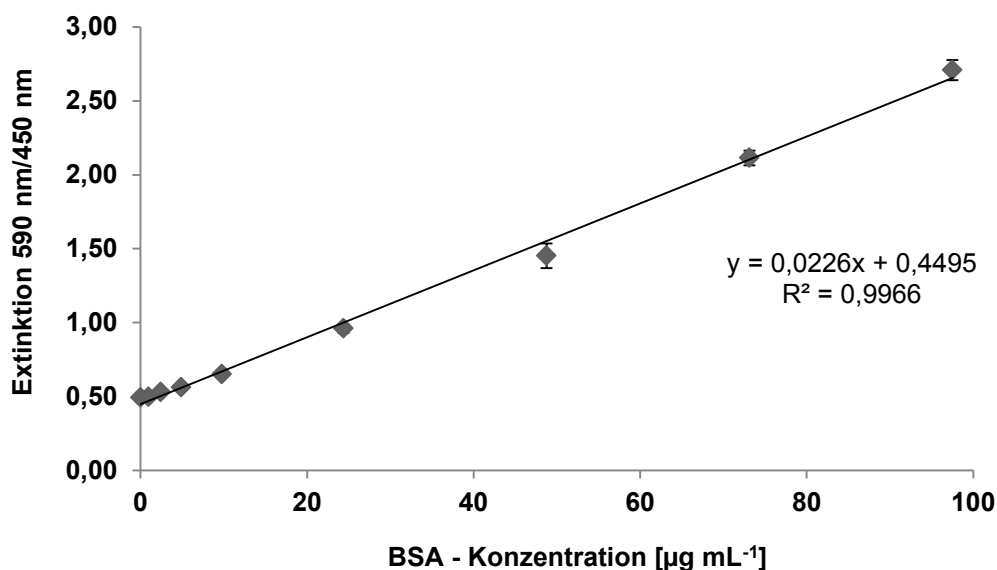


Abbildung 4.1: Kalibriergerade zur Proteinbestimmung nach Bradford ( $y = 0,0226x + 0,4495$ ;  $R^2 = 0,9966$ ).

## 4.6 Probenvorbereitung für die Chromatographie

### 4.6.1 Extraktion der nicht-flüchtigen Inhaltsstoffe

#### ***Extraktion des Kulturüberstands***

Die mycelfreien Kulturüberstände (4.5.1, BFM) wurden mit Ethylacetat im Verhältnis 1:1 einmal extrahiert. Die organische Phase wurde abdekantiert und über Natriumsulfat getrocknet. Danach wurde sie in einen 50 mL Rundkolben überführt und mit dem Rotationsverdampfer bei 240 mbar und einer Badtemperatur von 40 °C bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde anschließend durch vorsichtiges Schwenken in 1 mL Acetonitril aufgenommen. Der Extrakt des Kulturüberstandes wurde vor der HPLC-Analyse mit einem Spritzenfilter (Chromafil® PET-45/15 MS, Porengröße 0,45 µm, Macherey-Nagel, Düren) membranfiltriert.

#### ***Extraktion des Mycels***

Für die Bestimmung der Produktkonzentration im Mycel wurde das Mycel nach der Zellabtrennung durch Zentrifugation (4000 rpm, 2880 g, 10 min bei 4 °C) direkt mit Ethylacetat zweimal extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wurde wie oben (*Extraktion des Kulturüberstands*) beschrieben verfahren. Falls die Proben nicht sofort analysiert werden konnten, wurden sie bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Untersuchung der Effektivität einer Zellaufschlussmethode wurde das Mycel nach der Zellabtrennung mit der in 4.7 beschriebenen Methode aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die aufgeschlossenen Zellen von der Flüssigkeit (Kulturüberstand oder Puffer) abgetrennt und mit Ethylacetat zweimal extrahiert. Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

Für die Reinigung der Rohextrakte mittels präparativer HPLC wurde das Mycel nach dem Zellaufschluss (4.7.4) zunächst zweimal mit Aceton für 30 min unter Rühren extrahiert. Die beiden Aceton-Phasen wurden vereinigt und mit Hilfe des



Rotationsverdampfers eingengt. Die verbleibende wässrige Phase wurde dann dreimal mit Ethylacetat (1/1, v/v) extrahiert. Die Ethylacetat-Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Der gewonnene Rohextrakt wurde vor der HPLC-Trennung bei -20 °C aufbewahrt.

#### ***Extraktion der Blindwerte***

Um nachzuweisen, dass die gesuchten Substanzen von den Pilzen produziert wurden und nicht aus den Nährmedien stammen, wurden die verwendeten Medien nach dem Autoklavieren ebenfalls extrahiert. Die Extraktion erfolgte nach 4.6.1 *Extraktion des Kulturüberstands*.

#### ***Extraktion der Fruchtkörper***

Ca. 160 g der Fruchtkörper wurden mittels Pürierstab homogenisiert. Die Probe wurde mit 500 mL Aceton versetzt, eine Stunde im Ultraschallbad behandelt und anschließend zwei Stunden unter Rühren extrahiert. Die Abtrennung der Fruchtkörper erfolgte durch Filtration. Das organische Lösungsmittel wurde mittels Rotationsverdampfer abdestilliert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat (1/1, v/v) bzw. Dichlormethan (1/1, v/v) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Der Rohextrakt wurde vor dem Einsatz in die HPLC in Acetonitril aufgenommen und mit einem Membranfilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert.

#### 4.6.2 Extraktion der flüchtigen Inhaltsstoffe

Die von *H. erinaceus* in SNL, YM6,3 und ZM1/2-Medien produzierten Sekundärmetabolite wurden mit Pentan/Diethylether im Verhältnis von 1/1,12; v/v extrahiert und mittels GC-FID und GC-MS (Tabelle 4.28 und Tabelle 4.29) analysiert.

##### ***Extraktion des Kulturüberstands***

Die mycelfreien Kulturüberstände (4.5.1, BFM) wurden dreimal mit dem gleichen Volumen Pentan/Diethylether (1/1,12; v/v) im Scheidetrichter extrahiert. Eventuell auftretende Emulsionen wurden durch Zentrifugation getrennt. Nach Vereinigung der organischen Lösungsmittel wurden die Extrakte über Natriumsulfat getrocknet und anschließend über eine Vigreux-Kolonne auf ca. 1 mL konzentriert. Die Temperatur des Wasserbades betrug 45 °C. Jede aufkonzentrierte Probe wurde mit 100 µL internem Standard (Thymol, 750 mg L<sup>-1</sup> in Pentan/Diethylether (1/1,12; v/v)) versetzt. Je 1 µL der Probe wurde zur GC-Analyse injiziert.

##### ***Extraktion der Blindwerte***

Die Extraktion der verwendeten Nährmedien wurde ohne vorherige Zentrifugation wie in 4.6.2, *Extraktion des Kulturüberstands* beschrieben durchgeführt.

## 4.7 Zellaufschlussmethoden

Um die Extraktion der Sekundärmetabolite zu optimieren, wurden verschiedene Zellaufschlussmethoden getestet. *C. striatus* diente dazu als Modellorganismus. Das vom Kulturüberstand abgetrennte Mycel wurde in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (Tabelle 4.13) aufgenommen und anschließend aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurde das Mycel über Zentrifugation vom Puffer abgetrennt (4000 rpm, 2880 g, 10 min bei 4 °C). Neben der Analyse der Produktkonzentration (Aufarbeitung gemäß 4.6.1) ist auch die Bestimmung der Proteinkonzentration im Puffer (4.5.3) ein Maßstab zur Beurteilung der Wirksamkeit einer Aufschlussmethode. Die Gesamtprodukt- bzw. Proteinkonzentration ergibt sich aus der Analytmenge im Mycel und der Analytmenge im Kulturüberstand bzw. im Puffer, welche freigesetzt wurde. Die aufgeschlossenen Zellen wurden unter dem Mikroskop hinsichtlich der Teilchengröße untersucht und fotografisch dokumentiert.

Tabelle 4.13: 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH = 7,4.

Chemikalien	Konzentration [mM]	Volumen [mL]
Kaliumdihydrogenphosphat	50	802
Dikaliumhydrogenphosphat	50	198

### 4.7.1 Aufschlussmedium

Der Zellaufschluss wurde einmal in Pufferlösung und einmal im Kulturüberstand durchgeführt, um zu prüfen, ob der Zellaufschluss ohne vorheriges Waschen des Mycels direkt im Kulturüberstand durchgeführt werden kann. Das geerntete Mycel (Kulturtag 12) aus der Schüttelkultur (4.4.2) wurde mittels Büchnertrichter abgetrennt, in Bechergläser eingewogen und mit Kulturüberstand bzw. Puffer aufgefüllt. Der Aufschluss bestand aus einer Vorhomogenisierung mittels Ultra-

Turrax (15% BFM-Anteil w/v, 15.000 rpm, 10 min) und anschließend Aufschluss mittels Rührwerkskugelmühle ( $3.500 \text{ U min}^{-1}$ , Glasperlen-Ø 0,5 mm, 10 min). Die Parameter richteten sich nach Literatur- und Herstellerangaben.

Als Referenzwert für die Beurteilung der Effizienz des Aufschlusses diene das nicht aufgeschlossene Mycel direkt nach dem Ernten.

#### **4.7.2 Ultra-Turrax**

Das Mycel (aus Bioreaktor, Kulturtag 28) wurde in Bechergläser eingewogen und in Kaliumphosphat-Puffer (Tabelle 4.13, 4 °C) suspendiert. Der Zellaufschluss mittels Ultra-Turrax (15.000 rpm, 15 min) erfolgte auf Eis, um eine Denaturierung der Proteine zu vermeiden. Dabei wurde die Abhängigkeit vom BFM-Anteil untersucht (6,3%: 21,9 g/350 mL w/v, 130/350 v/v; 15%: 25,5 g/170 mL w/v, 70/170 v/v und 29,2%: 52,5 g/180 mL w/v, 120/180 v/v). Das aufgeschlossene Mycel wurde vom Puffer durch Zentrifugation (4000 rpm, 2880 g, 10 min bei 4 °C) abgetrennt. Eine definierte Mycelmenge wurde zur Analyse der Produktkonzentration eingewogen. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 4.6.1 beschrieben. Der abdekantierte Puffer wurde zur Bestimmung der freigesetzten Proteinkonzentration eingesetzt.

#### **4.7.3 Rührwerkskugelmühle**

Bevor der Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle durchgeführt wurde, wurde das Mycel-Puffergemisch mittels Ultra-Turrax homogenisiert, um eine geeignete Ausgangsgröße (ca. 200 µm) der Mycelpartikel für den Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle zu erhalten. Die zerkleinerten Proben aus 4.7.2 wurden teilweise zur Optimierung der Aufschlussparameter mittels Rührwerkskugelmühle weiter verwendet und dienten somit als Referenzwert. Drei Parameter wurden

untersucht: die Abhängigkeit von der Zeit, vom BFM-Anteil und von der Drehzahl (Tabelle 4.14). Als Ausgangswert wurden folgende Parameter festgelegt: Glasperlen-Ø 0,5 mm, Zellaufschlussdauer 20 min, BFM-Anteil 6% und Drehzahl 3.500 U min<sup>-1</sup>. Wurde ein Parameter variiert, wurden die übrigen Parameter auf die Ausgangswerte festgesetzt. Der Mahlkörperfüllgrad betrug jeweils 70%. Die Rührwerkskugelmühle wurde vor Beginn auf 4 °C gekühlt.

Tabelle 4.14: Übersicht über die untersuchten Parameter für den Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühle.

BFM [w/v %]	Drehzahl [U min <sup>-1</sup> ]	Zeit [min]
6	2.000	10
15	3.500	20
30	4.000	30
	5.000	40

### *Zeit*

Für den Zellaufschluss in Abhängigkeit von der Zeit wurde ein BFM-Anteil von 6,3% (21,9 g/350 mL w/v, 130/350 v/v), Glasperlen-Ø von 0,5 mm und eine Drehzahl von 3.500 U min<sup>-1</sup> verwendet. Nach 10, 20, 30 und 40 min wurden jeweils 50 mL Probe für die Striatum- und Proteinbestimmung entnommen. Das verwendete Mycel wurde im Vorfeld bei 15.000 rpm für 15 min mittels Ultra-Turrax vorhomogenisiert (4.7.2).

### *Drehzahl*

Es wurden vier Proben mit einer BFM von 5,5% (22,1 g/400 mL w/v, 100/400 v/v) in Puffer angesetzt. Zunächst erfolgte eine Homogenisierung für 15 min bei 15.000 rpm mittels Ultra-Turrax und anschließend ein Aufschluss mittels Rührwerkskugelmühle (Glasperlen-Ø 0,5 mm) für 20 min mit verschiedenen Drehzahlen (2.000, 3.500, 4.000 und 5.000 U min<sup>-1</sup>).

### *BFM-Anteil*

Die zur Untersuchung der Abhängigkeit des BFM-Anteils mittels Ultra-Turrax homogenisierten Proben (4.7.2) wurden weiter durch die Rührwerkskugelmühle aufgeschlossen ( $3.500 \text{ U min}^{-1}$ , Glasperlen-Ø 0,5 mm, 20 min).

### **4.7.4 Übertragung des Zellaufschlusses auf *H. erinaceus***

Die aus 4.7.1 bis 4.7.3 gewonnenen Erkenntnisse wurden für Mycelproben von *H. erinaceus* angewendet, indem die optimierten Bedingungen der einzelnen Zellaufschlussmethoden kombiniert wurden (Vorhomogenisierung des Mycels mittels Ultra-Turrax (15% BFM-Anteil w/v, 15.000 rpm, 15 min) und anschließender Aufschluss mit der Rührwerkskugelmühle (15% BFM-Anteil w/v,  $3.500 \text{ U min}^{-1}$ , Glasperlen-Ø 0,5 mm, 10 min) im Kulturüberstand).

In den nachfolgenden Experimenten, wie z. B. der Probeaufarbeitung für die präparative HPLC, wurde ein kombinierter Zellaufschluss direkt im Kulturüberstand eingesetzt.

## 4.8 Analytische Methoden

### 4.8.1 Analytische HPLC

#### 4.8.1.1 Nachweis der Striatale A und B und Erstellung der Kalibriergeraden

Die Identifizierung von Striatal A und B in einer Probe erfolgte über einen Vergleich der Retentionszeiten und der entsprechenden Molekülmassen im ESI-Positiv- bzw. Negativmodus mittels LC-MS (bei IMD) im Vergleich zu authentischen Referenzsubstanzen.

Die zur Analyse eingesetzte HPLC-Anlage (MERCK HPLC) ist in Tabelle 4.3 aufgelistet. In Tabelle 4.15 und Tabelle 4.16 sind die Systemparameter und der verwendete Gradient dargestellt. Die Kalibrierung erfolgte mit Standardsubstanzen im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 1,0 mg mL<sup>-1</sup> ACN in Doppelbestimmung (Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3).

Tabelle 4.15: Systemparameter der MERCK HPLC-Anlage zur Striatal-Analytik.

Komponente	Modell/Parameter
Vorsäule	CC 8/3 Nucleosil® 100-5 C <sub>18</sub> , Macherey-Nagel
Trennsäule	CC 125/3 Nucleosil® 100-5 C <sub>18</sub> , Macherey-Nagel
Injektionsvolumen	10 µL
Eluent A	ACN
Eluent B	H <sub>2</sub> O
Flussrate	0,4 mL min <sup>-1</sup>
Datenaufnahme	D-7000 HSM
Wellenlänge	210 nm, 233 nm, 238 nm und 254 nm mittels DAD

Tabelle 4.16: Gradient der MERCK HPLC zur Striatale-Analytik.

Zeit [min]	ACN [%]	H <sub>2</sub> O [%]
0	50	50
14	94	6
17	94	6
19	100	0
25	100	0
30	50	50
40	50	50

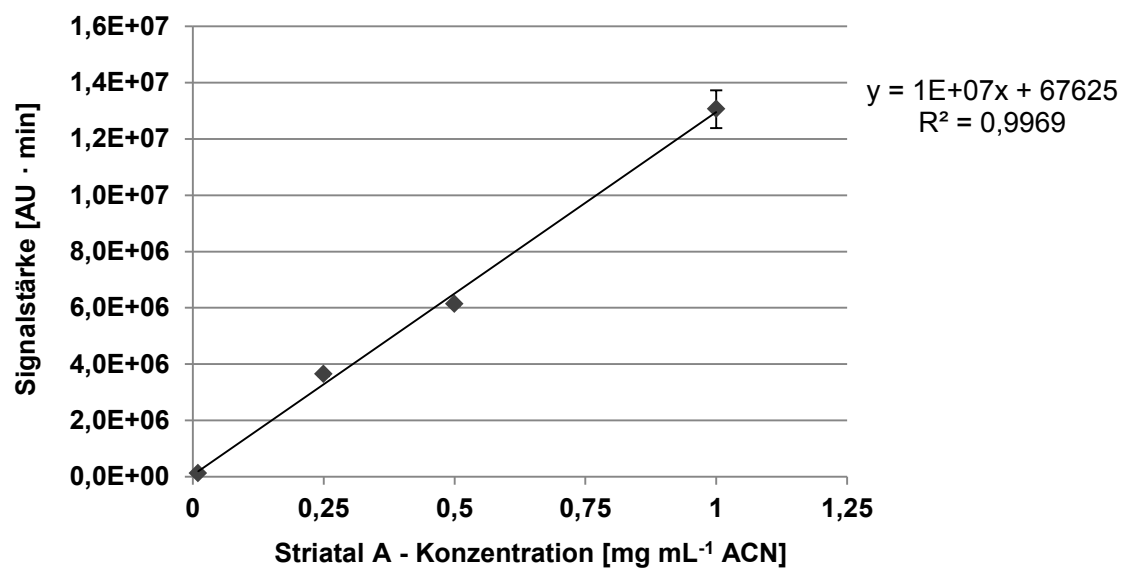


Abbildung 4.2: Kalibriergerade für Striat A.



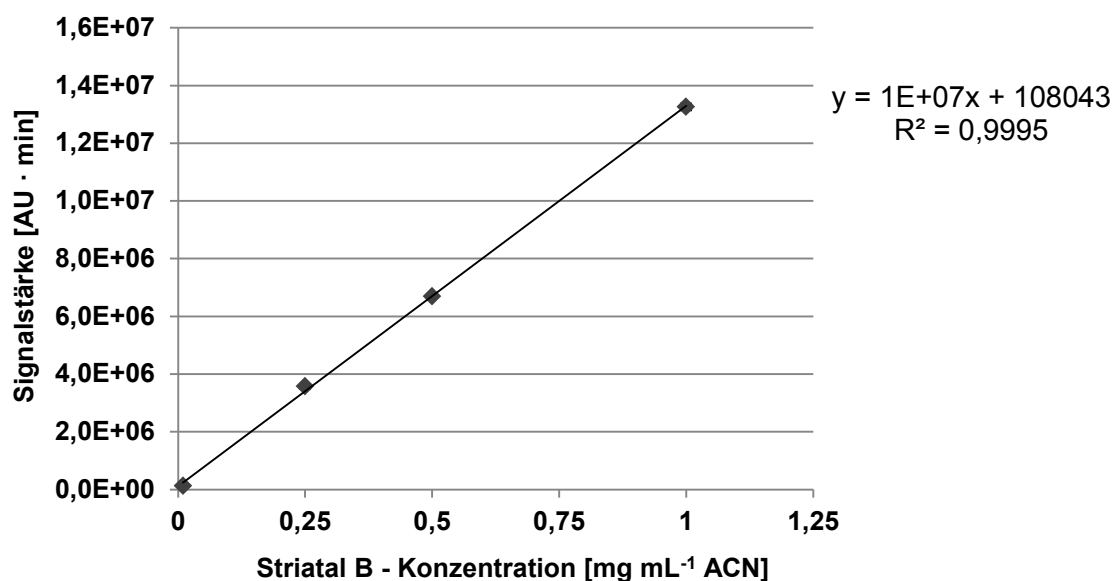


Abbildung 4.3: Kalibriergerade für Striatat B.

#### 4.8.1.2 Nachweis der Erinacine C und P und Erstellung der Kalibriergeraden

Die Identifizierung von Erinacin C und P in einer Probe erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten und der entsprechenden Molekülmassen im ESI-Positiv- bzw. Negativmodus mittels LC-MS (bei IMD) im Vergleich zu authentischen Referenzsubstanzen.

Die zur Analyse eingesetzte HPLC-Anlage (MERCK HPLC) ist in Tabelle 4.3 aufgelistet. Die Systemparameter waren ähnlich wie bei der Striatat-Analytik (Tabelle 4.15). Abweichend wurde die Flussrate von 0,4 mL min<sup>-1</sup> auf 0,6 mL min<sup>-1</sup> eingestellt. Aus Tabelle 4.17 ist der verwendete Gradient zu entnehmen. Die Kalibrierung von Erinacin C erfolgte mit Standardsubstanzen im Konzentrationsbereich von 0,05 bis 2,0 mg mL<sup>-1</sup> ACN in Doppelbestimmung (Abbildung 4.4). Die Kalibrierung von Erinacin P erfolgte mit Standardsubstanzen im Konzentrationsbereich von 0,0025 bis 2,0 mg mL<sup>-1</sup> ACN in Doppelbestimmung (Abbildung 4.5).

Tabelle 4.17: Gradient der MERCK HPLC zur Erinacine-Analytik.

Zeit [min]	ACN [%]	H <sub>2</sub> O [%]
0	30	70
15	50	50
16	50	50
23	100	0
38	100	0
43	30	70
47	30	70

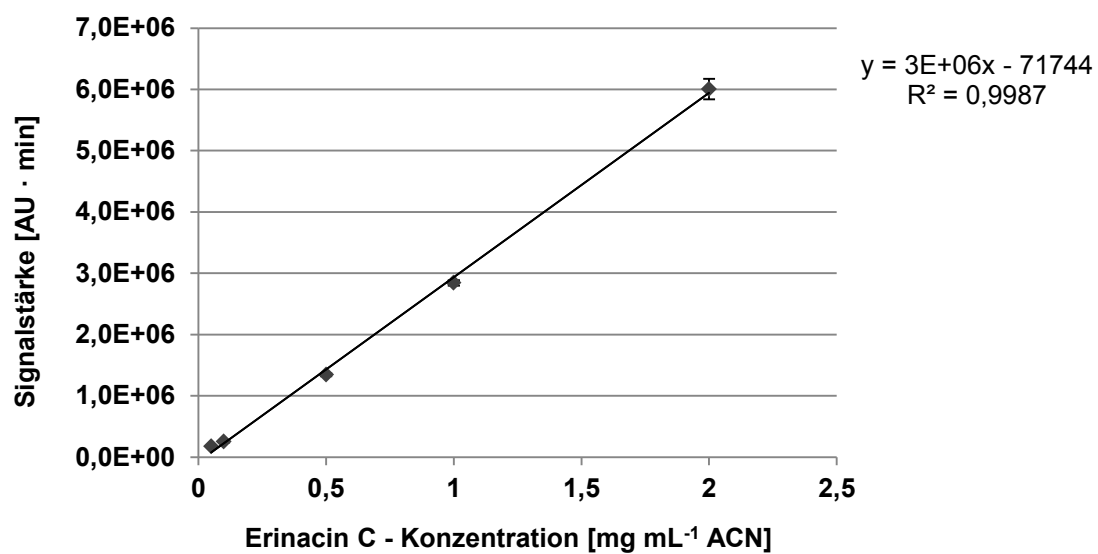


Abbildung 4.4: Kalibriergerade für Erinacin C.

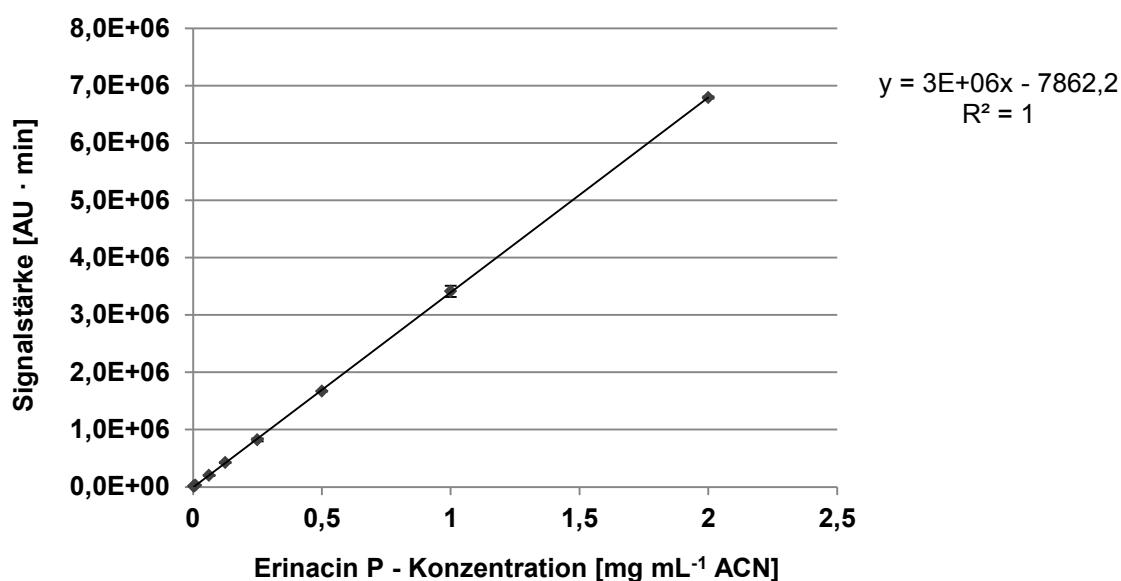


Abbildung 4.5: Kalibriergerade für Erinacin P.

## 4.8.2 Präparative HPLC

### 4.8.2.1 Inhaltsstoffe von *C. striatus*

Für die Isolierung der Inhaltsstoffe aus dem Ethylacetat-Rohextrakt wurden die präparative HPLC 2 (Tabelle 4.3) mit den Trennsäulen Nr. 3 und 6 (Tabelle 4.4) verwendet. Weitere Methodenparameter sind Tabelle 4.18 und Tabelle 4.19 zu entnehmen. Die gesammelten Fraktionen wurden in Rundkolben überführt und mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die gewonnenen Rückstände wurden in 2 bis 5 mL ACN aufgenommen, in ein vorher tariertes Glasvial überführt und anschließend mittels SpeedVac oder Konzentrator bis zur Trockne eingengt. Das Gewicht der Fraktion wurde durch erneutes Wiegen des Glasvials ermittelt.

Tabelle 4.18: Methodenparameter zur Auftrennung der Inhaltsstoffe aus dem Ethylacetat-Rohextrakt von *C. striatus*.

Komponente	Modell/Parameter
Injektionsschleife	5 mL
Eluent A	ACN + 0,1% TFA
Eluent B	Wasser + 0,1% TFA
Flussrate	20 mL min <sup>-1</sup>
Temperatur	Raumtemperatur
Wellenlänge	210 nm und 254 nm

Tabelle 4.19: Gradient zur Auftrennung der Inhaltsstoffe aus dem Ethylacetat-Rohextrakt von *C. striatus*.

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	50	50
10	50	50
30	80	20
45	80	20
60	100	0
90	100	0

Für die Isolierung der Inhaltsstoffe aus dem MeOH-Rohextrakt wurde die präparative HPLC 1 (Tabelle 4.3) mit den Trennsäulen Nr. 2 und 5 (Tabelle 4.4) verwendet. Die Methodenparameter sind Tabelle 4.18 und Tabelle 4.20 zu entnehmen. Die Flussrate wurde anstelle von 20 mL min<sup>-1</sup> auf 15 mL min<sup>-1</sup> eingestellt. Die weitere Aufarbeitung der gesammelten Fraktionen erfolgte wie oben beschrieben.

Tabelle 4.20: Gradient zur Auftrennung der Inhaltsstoffe aus dem MeOH-Rohextrakt von *C. striatus*.

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	50	50
10	50	50
55	80	20
70	80	20
80	100	0
95	100	0

#### 4.8.2.2 Inhaltsstoffe von *H. erinaceus*

Für die Isolierung der Inhaltsstoffe aus der Submerskultur von *H. erinaceus* wurde die präparative HPLC 3 (Tabelle 4.3) mit den Trennsäulen Nr. 1 und 5 (Tabelle 4.4) verwendet, und für die Isolierung der Inhaltsstoffe aus dem Fruchtkörper die präparative HPLC 1 (Tabelle 4.3) mit den Trennsäulen Nr. 2 und 5 (Tabelle 4.4). Die weiteren Methodenparameter sind Tabelle 4.21 und Tabelle 4.22 zu entnehmen. Mit den gesammelten Fraktionen wurde wie in 4.8.2.1 beschrieben verfahren.

Tabelle 4.21: Methodenparameter zur Auftrennung der Inhaltsstoffe aus *H. erinaceus*.

Komponente	Modell/Parameter
Injektionsschleife	5 mL
Eluent A	ACN
Eluent B	Wasser
Flussrate	20 oder 15 mL min <sup>-1</sup>
Temperatur	Raumtemperatur
Wellenlänge	210/254 nm oder 233/366 nm

Tabelle 4.22: Gradient zur Auftrennung der Inhaltsstoffe aus *H. erinaceus*.

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	25	75
10	25	75
35	48	52
45	48	52
52	55	45
60	55	45
90	100	0
110	100	0

### 4.8.3 Massenspektrometrie

Zur Reinheitsüberprüfung einer isolierten Substanz sowie einer Massenbestimmung wurde die Massenspektrometrie eingesetzt. Die Geräte und die Methode, die während des Aufenthalts bei IMD verwendet wurden, sind in den Tabelle 4.3, Tabelle 4.23 und Tabelle 4.24 dargestellt.

Tabelle 4.23: Methodenparameter zur Reinheitsüberprüfung bei IMD.

Komponente	Modell/Parameter
Injektionsschleife	2 $\mu\text{L}$
Säule	Waters symmetry C <sub>18</sub> , 150 x 2,1 mm, 3,5 $\mu\text{m}$
Eluent A	Wasser + 0,1% Formiat
Eluent B	ACN + 0,1% Formiat
Flussrate	0,4 mL min <sup>-1</sup>
Temperatur	40°C
Wellenlänge	210 nm
ELSD	40 °C, 3 bar, N <sub>2</sub>

Tabelle 4.24: Gradient zur Reinheitsüberprüfung sowie einer Massenbestimmung.

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	100	0
20	0	100
25	0	100
25,1	100	0
32	100	0

Die Daten der LC-MS-Messungen wurden mit der firmeneigenen (IMD) Naturstoff-Datenbank verglichen (> 200.000 Substanzen aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen). Zusätzlich war ein Abgleich mit AntiBase (~32.000 Substanzen) und dem „*Dictionary of Natural Products*“ (~140.00 Substanzen) möglich. Bereits bekannte Substanzen konnten von nicht bekannten eindeutig unterschieden werden.

#### 4.8.4 HPLC-NMR

Unbekannte Verbindungen wurden in DMSO-D<sub>6</sub> bei 302 K gelöst und vom Projektpartner IMD am Bruker DRX 500 analysiert. Mögliche Aufnahmearten waren: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H<sup>1</sup>H-COSY, <sup>1</sup>H<sup>13</sup>C-HSQC, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HMBC, <sup>1</sup>H<sup>1</sup>H-NOESY.

Die Strukturen von Striatal A, C, D, Striatin A, B und C und Erinacin P wurden mit Hilfe von Frau Heike Hausmann der NMR-Abteilung der organischen Chemie, JLU Gießen aufgeklärt. Die Substanzen wurden in CDCl<sub>3</sub> bzw. D<sub>4</sub>-MeOH bei 25°C gelöst und am Bruker Ultra Shield™ 600 Hz über <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-Dept 135, <sup>1</sup>H-COSY, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HSQC und <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HMBC gemessen.

#### 4.8.5 HPTLC

Die HPTLC wurde angewendet, um zum einen die Rohextrakte von *H. erinaceus* zu analysieren und zum anderen die durch präparative HPLC isolierten Fraktionen auf ihre Reinheit zu überprüfen. Ebenso diente die HPTLC als eine Vergleichsmethode zur HPLC. Die verwendeten HPTLC-Platten (Tabelle 4.3) wurden zuvor mit Methanol und Wasser im Verhältnis 4:1 gewaschen, um mögliche Verunreinigungen aus dem Herstellungsprozess zu entfernen.

#### **Produktbildungskinetik**

Jeden Tag wurden 20 mL Kulturüberstand aus den Submerskulturen von *H. erinaceus* (400 mL Kulturmedium + 40 mL Innokulum in 1 L Erlenmeyerkolben) entnommen und mit 20 mL Ethylacetat extrahiert. 15 mL der Ethylacetatphase wurden entnommen, bis zur Trockne eingeeengt und anschließend in 1 mL Acetonitril wieder aufgenommen. Die aufgearbeiteten Proben wurden mittels Autosampler auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Das Auftragsvolumen betrug je nach Probekonzentration 6, 10 oder 15 µL. Ebenfalls wurden die Proben mittels HPLC-DAD analysiert (4.8.1.2).



**Laufmittelzusammensetzung und Dokumentation**

Die Entwicklung der HPTLC-Platte wurde in einer Doppeltrogkammer durchgeführt. In einem Trog wurde das Laufmittel (9 mL) zugegeben, das aus n-Hexan : Ethylacetat : Methanol in der Zusammensetzung 3 mL : 5,5 mL : 0,5 mL bestand. In den zweiten Trog wurde 1 mL Essigsäure pipettiert. Bei einer Laufröhre von 68 mm wurde die Entwicklung abgebrochen.

Die Dokumentation erfolgte mittels TLC-Visualizer bei 254 und 366 nm sowie bei Weißlicht im Reflexions-/Transmissions-Modus (R/T-Modus).

**Bestimmung der maximalen UV-Absorption**

Das UV/Vis-Spektrum einer aufgetrennten Zone wurde mit dem TLC Scanner 4 aufgenommen. Der Scanbereich betrug 200 bis 800 nm. Nach Bestimmung des jeweiligen Absorptionsmaximums wurde die aufgetrennte Bande bei der entsprechenden Wellenlänge gescannt, um die Substanz zu quantifizieren.

**Bioaktivitätstest**

Das Herstellen des Kulturmediums und die Züchtung der *Vibrio fischeri*-Bakterien erfolgten gemäß dem Bioluminex Assay-Kit (Artikelnummer KIT-00002750-001, Chromadex, Boulder, USA). Die *Vibrio fischeri*-Bakteriensuspension setzte sich zusammen aus Bioluminex Bacterium A Vial, Bioluminex Medium A sowie Bioluminex Medium B.

Nach Abdampfen des Fließmittels und Abkühlung der HPTLC-Platte wurde die Platte mittels einer automatisierten Tauchvorrichtung homogen mit der *Vibrio fischeri*-Bakteriensuspension benetzt (Eintauchzeit: 1 s, Tauchgeschwindigkeit: 4 cm s<sup>-1</sup>). Nach Abziehen der nassen Plattenoberfläche mit einem Plattenabzieher wurde die HPTLC-Platte mit dem BioLuminizer™ nach unterschiedlichen Zeiten dokumentiert.

BioLuminizer™ (CAMAG)

Kamera: CCD 12 bit

Bildakkumulationszeit: 50 s

**Derivatisierung**

Um das Ermitteln einer Summenformel zu erleichtern, wurde ein Rohextrakt (Tag 4) auf eine Platte aufgetragen und entwickelt. Im Anschluss wurde die Platte in neun Teile geschnitten und mit verschiedenen Reagenzien derivatisiert (jeweils in Doppelbestimmungen). Im Folgenden wird auf die verwendeten Derivatisierungsreagenzien näher eingegangen.

DPPH-Radikal (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)-Reagenz

20 mg DPPH wurden in einen 100 mL-Messkolben eingewogen, in Methanol gelöst und bei 20 °C bis zur Eichmarke aufgefüllt. Die Platte wurde nach dem Tauchen sofort unter Weißlicht im R/T-Modus fotografiert, ohne dass sie vorher dem Licht ausgesetzt war. Mit dieser Methode werden Antioxidantien nachgewiesen. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ist ein stabiles, kommerziell erhältliches organisches Radikal mit einem Absorptionsmaximum bei 515 nm. In Anwesenheit von Antioxidantien wird DPPH\* zum Hydrazin-Derivat reduziert (Abbildung 4.6). Diese Reaktion führt in Abhängigkeit von der antioxidativen Kapazität und der Konzentration des untersuchten Antioxidans zu einer Entfärbung von DPPH\* (Jork, 1990).

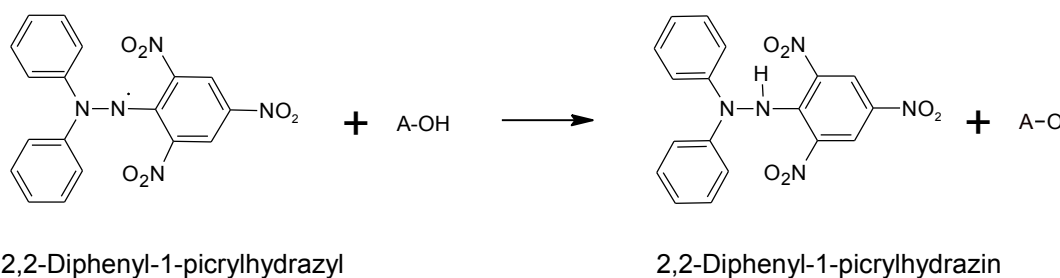


Abbildung 4.6: Reaktion von 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl mit Antioxidantien (A-OH).

Diphenylamin-Anilin (DPA)-Reagenz

100 mL Anilin (2% in Aceton, w/v) wurden mit 100 mL Diphenylamin-Lösung (2% in Aceton, w/v) versetzt und mit 20 mL *ortho*-Phosphorsäure (85%ig) unter Rühren vermischt. Nach dem Eintauchen wurde die Platte auf dem Plattenerhitzer bei 110 °C für 5 min entwickelt. Die Detektion erfolgte unter Weißlicht im Transmissions-Modus (T). Dieses Verfahren ermöglicht den Nachweis von Zuckern. Beim Erhitzen von Zuckern mit starken Säuren, in diesem Fall der Phosphorsäure, entstehen Furfural-Derivate. Aldohexosen können Formaldehyd und Wasser abspalten und dabei in Furfural übergehen. Furfural kann nach Reaktion 1 mit Aminen unter Bildung von farbigen Schiffschen Basen (Iminen) reagieren (Abbildung 4.7). Ketohexosen kondensieren unter sauren Bedingungen mit Diphenylamin unter gleichzeitiger Oxidation zu Produkt (2). Aldohexosen färben sich dunkelgrau bis graublau, Saccharose braun, Lactose hellblau-grau, Ketohexosen olivgrün und Pentosen färben sich graugrün bis hellgrün (Jork, 1990).

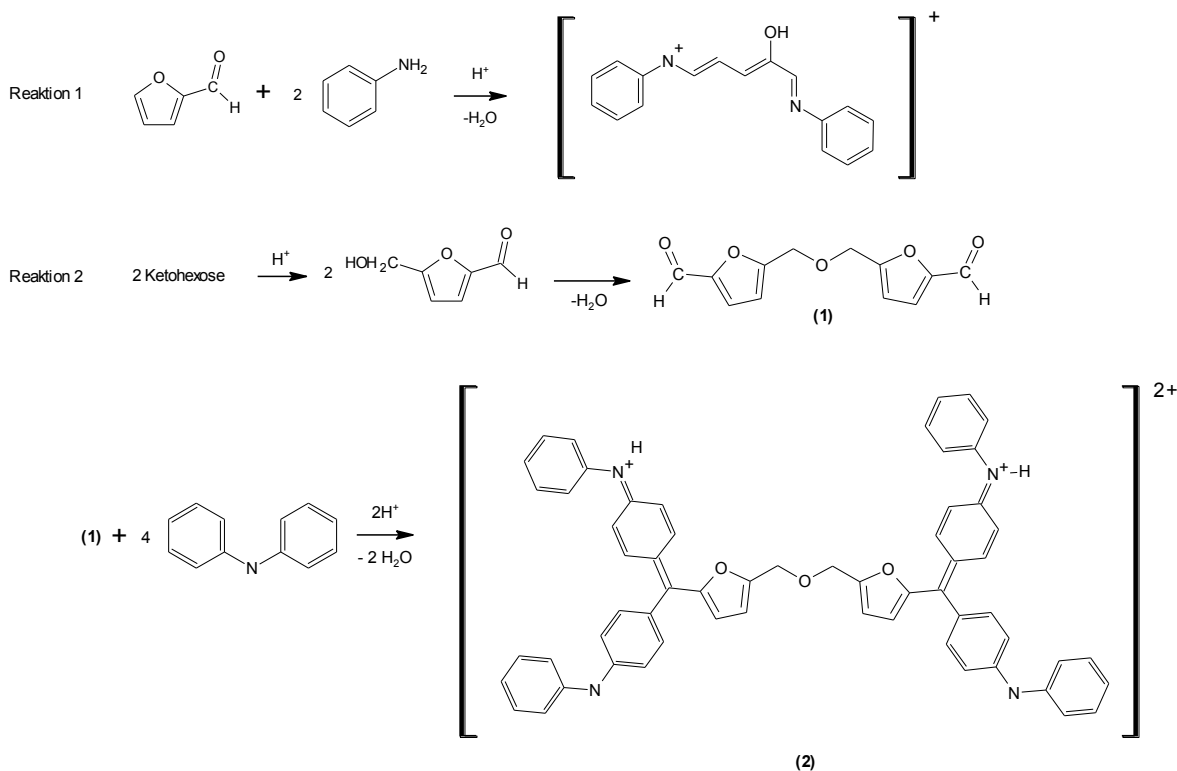


Abbildung 4.7: Reaktion von Aldohexosen und Ketohexosen mit Aminen und Diphenylamin.

### Primulin-Reagenz

2 g Primulin wurden eingewogen, 10 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dazugeben und mit 390 mL Methanol aufgefüllt. In Anwesenheit von lipophilen Gruppen wie z. B. Phospholipiden bildet sich ein Farbstoff, der bei 366 nm absorbiert. Dieser Farbstoff (Abbildung 4.8) bindet nichtkovalent an die unpolaren Reste von Lipiden, die nach dem Trocknen der Platte unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können (Jork, 1990).

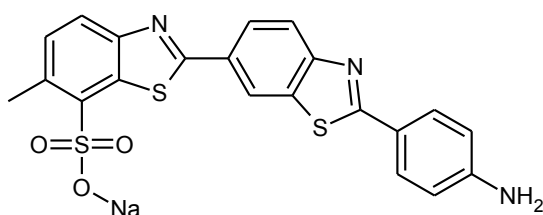


Abbildung 4.8: Strukturformel von Primulin.

### Echtblausalz B-Reagenz

100 mg Echtblausalz B wurden in einen 100 mL Messkolben eingewogen und bei 20 °C mit 1 M Natronlauge bis zur Eichmarke aufgefüllt. Die Detektion erfolgte unter Weißlicht im R/T-Modus. Hierdurch wird ein Nachweis von Phenolen und Gerbstoffen ermöglicht. Im sichtbaren Licht zeigt eine rote gefärbte Zone (Abbildung 4.9), im UV-Licht (366 nm) eine dunkelblaue Zone auf dem blassblauen Fluoreszenz-Untergrund (Jork, 1990).

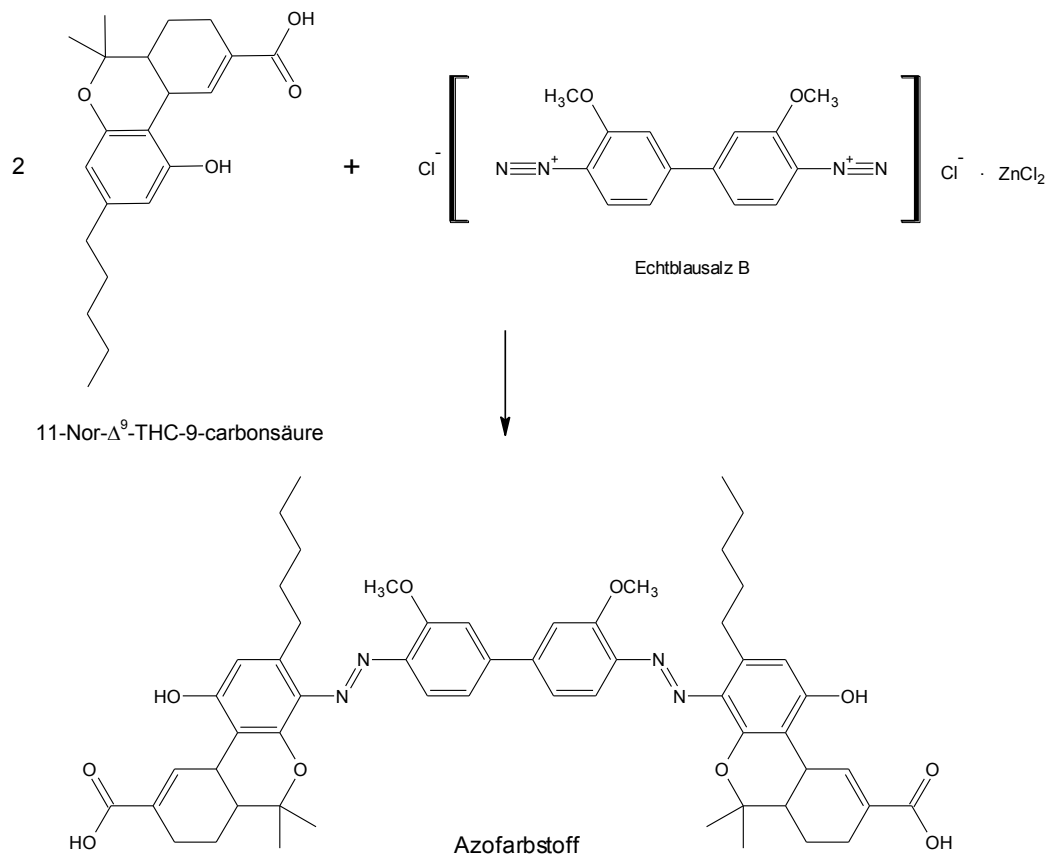


Abbildung 4.9: Kupplung von Echtblausalz B mit Phenolderivaten.

**AlCl<sub>3</sub>-Reagenz**

1 g AlCl<sub>3</sub> wurde in einen 100 mL Messkolben eingewogen, in Methanol gelöst und bei 20 °C bis zur Eichmarke aufgefüllt. Die Detektion erfolgte unter UV-Belichtung bei einer Wellenlänge von 366 nm. Hiermit werden ungesättigte 1,2- und 1,3-Dihydroxyketone wie z. B. Flavonoide (Abbildung 4.10), Mykotoxine, Phospholipide, sowie Triglyceride nachgewiesen. Im UV-Licht (366 nm) zeigt sich bei Flavonoiden eine Gelbfärbung, bei Mykotoxinen wie Citrin, Zearalenon und Vomitoxin eher eine Blaufärbung (Jork, 1990).

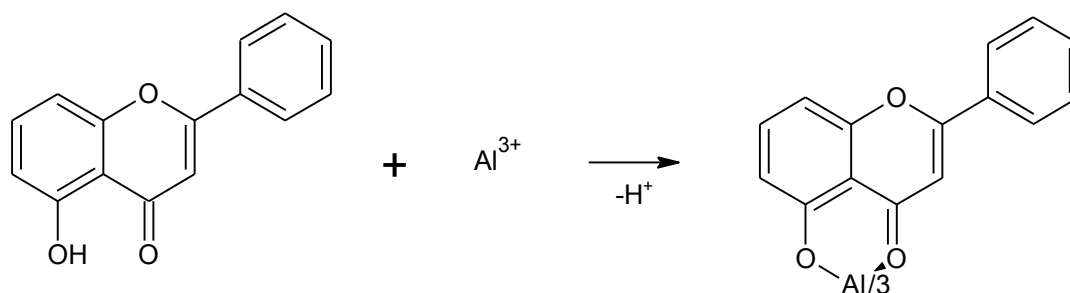


Abbildung 4.10: Reaktion eines Flavonoids mit Aluminiumchlorid unter Bildung eines fluoreszierenden Komplexes.

### Ninhydrin-Reagenz

100 mg Ninhydrin wurden in einen 100 mL Messkolben eingewogen, in Methanol gelöst und bei 20 °C bis zur Eichmarke aufgefüllt. Nach dem Eintauchen wurde die Platte auf dem Plattenerhitzer bei 110 °C für 5 min entwickelt. Die Detektion erfolgte unter Weißlicht im T-Modus. Hierdurch ist der Nachweis von primären Aminen, Aminosäuren und Peptiden möglich (Abbildung 4.11). Bei deren Anwesenheit zeigt eine rötlich oder gelegentlich blaue Färbung (Jork, 1990).

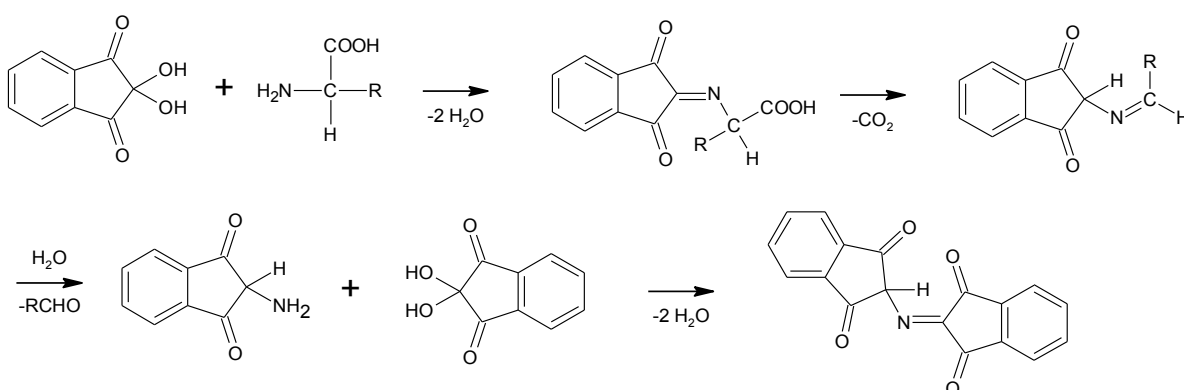


Abbildung 4.11: Reaktion von Ninhydrin mit einem primären Amin.

Naturstoffreagenz nach NEU

2,5 g Diphenylborsäure-2-aminoethylester wurden in einen 500 mL-Messkolben eingewogen, in Methanol gelöst und bei 20 °C bis zur Eichmarke aufgefüllt (Lösung 1). Des Weiteren wurden 10 mL Polyethylenglycol in einem 200 mL-Messkolben eingewogen, in Methanol gelöst und bei 20 °C ad Marke aufgefüllt (Lösung 2). Zunächst wurde die Platte mit Lösung 1 behandelt. Die Detektion erfolgte unter UV-Belichtung bei einer Wellenlänge von 366 nm. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Lösung 2. Die Detektion erfolgte ebenfalls unter UV-Belichtung bei einer Wellenlänge von 366 nm. Hiermit können Flavonoide, aber auch Kohlenhydrate, wie Glucose oder Fructose, sowie Anthocyanidine und Hydroxyzimtsäuren identifiziert werden. PEG dient der Verstärkung der Banden. Im langwelligeren UV-Licht (366 nm) erscheint eine charakteristische fluoreszierende Substanzzone (Abbildung 4.12) (Jork, 1990).

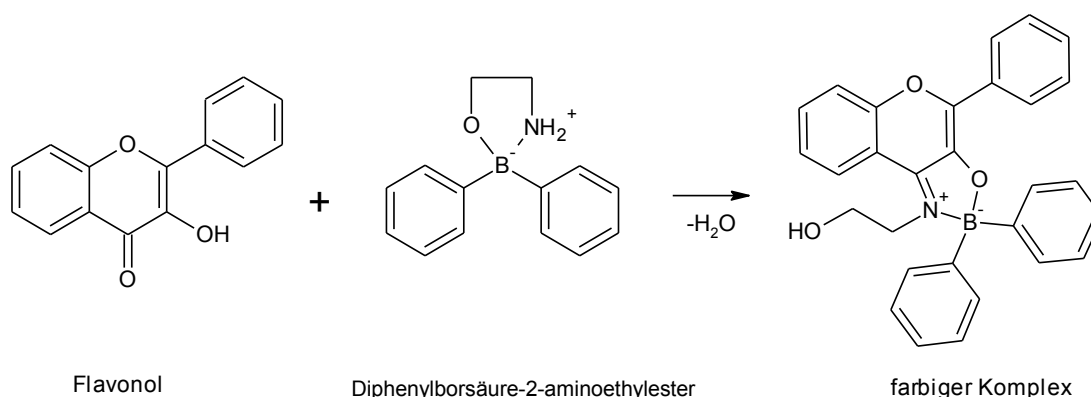


Abbildung 4.12: Reaktion von Flavonol mit NEU's- Reagenz zu farbigem Komplex.

**HPTLC-MS-Kopplung**

Das TLC-MS-Interface wurde an eine HPLC-Pumpe angeschlossen, die den Eluenten, z. B. ACN oder MeOH, mit  $0,1 \text{ mL min}^{-1}$  förderte. Die bei einer Belichtung mit 254 nm und 366 nm detektierten Zonen einer fertig entwickelten Platte wurden mittels TLC-MS-Interface über eine Verbindungskapillare in das ESI-Interface eines Massenspektrometers eluiert und unter dem Modus

„Hintergrund subtrahieren“ analysiert. Die Reinigung des Elutionskopfes erfolgte nach jeder Elution durch einen Luft-/Gasstrom (hier CO<sub>2</sub>-Gas).

#### ***TLC in Kombination mit NMR***

Die Substanz wurde aus der HPTLC-Platte ( $hR_F = 34$ ) in ein Glasvial überführt (Sammelzeit 60 s) und gefriergetrocknet. Anschließend wurde sie in D<sub>4</sub>-MeOH bzw. CDCl<sub>3</sub> bei 25 °C gelöst und am Bruker Ultra Shield™ 600 Hz über <sup>1</sup>H gemessen.

### **4.8.6 MALDI-Imaging**

#### ***Probenvorbereitung***

Als Probe diente ein intaktes Pilzpellet einer Submerskultur (12 Tage aus *C. striatus* und 10 Tage aus *H. erinaceus*) bzw. ein kleines Stück des Fruchtkörpers von *H. erinaceus*. Eine kleine Cryobox (25 x 25 x 5 mm) wurde mit 4%iger Carboxymethylcellulose (CMC gelöst in Reinstwasser, w/v) befüllt, das Pilzpellet in die CMC gelegt und die Probe bei -80 °C für 20 min eingefroren. Danach wurde das Pellet mittels Kryotom bei -20 °C in Scheiben mit einer Schichtdicke von 20 µm geschnitten und sofort auf den Objektträger übertragen. Nach der Fotoaufnahme unter einem Mikroskop wurde dieser Ausschnitt mittels einer pneumatischen Spritzenpumpe bei einer Flussrate von 10 µL min<sup>-1</sup> für 20 min mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure-Lösung (DHB, 30 mg mL<sup>-1</sup> in 1/1, v/v, Aceton/Wasser mit 0,1% Trifluoressigsäure) besprüht. Diese Probe wurde für die MALDI-MS-Analyse verwendet, wobei DHB als Protonendonator für die positiv ionisierbaren Moleküle dient.



### Analyse und Generierung des Imagings

Die  $m/z$ -Verhältnisse der Standardsubstanzen Striatal A und B sowie von Erinacin C wurden zuvor im positiven Ionisierungsmodus gemessen, um die Zielmassen bei späterer Analyse der Probe festlegen zu können. Die theoretisch exakten Massen der Standards sind Tabelle 4.25 zu entnehmen.

Tabelle 4.25: Berechnete theoretisch exakte Massen der Standards.

Standard	Summenformel	[M]	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>
Striatal A	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O <sub>7</sub>	472,24610	473,25338	495,23532	511,20926
Striatal B	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	488,24102	489,24829	511,23024	527,20418
Erinacin C	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub>	434,26684	435,27412	457,25606	473,23000

Mit: H = 1,007825

Na = 22,98977

K = 38,96371

e = 0,0005485799

Beispielberechnung:  $[M+H]^+ = M + 1,007825 - 0,0005485799$

Die Genauigkeit der gemessenen Massen betrug 2 ppm. In den Tabelle 4.26 und Tabelle 4.27 sind die Massen der gesuchten Cyathan-Diterpenoide sowie der Sekundärmetabolite, die im Fruchtkörper von *H. erinaceus* vorkommen, aufgelistet.

Tabelle 4.26: Cyathan-Diterpenoide mit den theoretisch berechneten exakten Massen.

Substanz	Summenformel	[M]	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>
Striatal C	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	446,23045	447,23773	469,21967	485,19361
Striatal D	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	430,23554	431,24282	453,22476	469,19870
Erinacin A	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	432,25119	433,25847	455,24041	471,21435
Erinacin B	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	432,25119	433,25847	455,24041	471,21435
Erinacin D	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>7</sub>	478,29306	479,30033	501,28228	517,25621
Erinacin E	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	432,25119	433,25847	455,24041	471,21435
Erinacin F	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	432,25119	433,25847	455,24041	471,21435
Erinacin I	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	360,23006	361,23734	383,21928	399,19322
Erinacin J	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>8</sub>	466,25667	467,26395	489,24589	505,21983
Erinacin K	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>8</sub>	494,28797	495,29525	517,27719	533,25113
Erinacin P	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> O <sub>8</sub>	492,27232	493,27960	515,26154	531,23548
Erinacin Q	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>8</sub>	494,28797	495,29525	517,27719	533,25113
Erinacin R	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub>	506,25159	507,25886	529,24081	545,21474

Tabelle 4.27: Sekundärmetabolite im Fruchtkörper von *H. erinaceus* mit den theoretisch berechneten exakten Massen.

Substanz	Summenformel	[M]	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>
Erinacerin A	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub> N	433,22531	434,23259	456,21453	472,18847
Erinacerin B	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	332,16238	333,16965	355,15160	371,12553
Hericenon A	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	330,14673	331,15400	353,13595	369,10988
Hericenon B	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub> N	433,22531	434,23259	456,21453	472,18847
Hericenon C	C <sub>35</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub>	570,39204	571,39932	593,38126	609,35520
Hericenon D	C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub>	598,42334	599,43062	621,41256	637,38650
Hericenon E	C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub>	594,39204	595,39932	617,38126	633,35520
Hericenon F	C <sub>35</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub>	570,39204	571,39932	593,38126	609,35520
Hericenon G	C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub>	598,42334	599,43062	621,41256	637,38650
Hericenon H	C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub>	594,39204	595,39932	617,38126	633,35520
Hericenon I	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	330,14673	331,15400	353,13595	369,10988
Hericenon J	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	316,16746	317,17474	339,15668	355,13062
Hericerin	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> O <sub>3</sub> N	419,24604	420,25332	442,23526	458,20920
Isohericerin	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> O <sub>3</sub> N	419,24604	420,25332	442,23526	458,20920
N-De phenylethyl isohericerin	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> O <sub>3</sub> N	315,18344	316,19072	338,17266	354,14660
1-D-Arabinitol- monolinolsäure	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>6</sub>	428,31379	429,32107	451,30301	467,27695
Hericen A	C <sub>35</sub> H <sub>56</sub> O <sub>5</sub>	556,41278	557,42005	579,40200	595,37593
3-Hydroxy- hericenon F	C <sub>35</sub> H <sub>54</sub> O <sub>7</sub>	586,38696	587,39423	609,37618	625,35011

Die Probe wurde mit einer zweidimensionalen Auflösung von 10  $\mu\text{m}$  gemessen (x und y-Richtung). Der Massenbereich zwischen 300 und 1000 Da wurde aufgenommen. Alle MS-Imagings wurden mittels einer Software (eigene Entwicklung von AG Spengler, Analytische Chemie, Justus-Liebig-Universität Gießen) mit einem Massenfenster von  $\Delta m/z = 0,01$  (Massenbereich, der zur Erzeugung eines Imagings verwendet wurde) generiert.

#### 4.8.7 Gaschromatographie

Die Proben wurden mittels GC-FID und GC-MS analysiert (Tabelle 4.28 und Tabelle 4.29). Die Identifizierung der flüchtigen Verbindungen erfolgte mit Hilfe von Referenzsubstanzen, dem Vergleich der ermittelten Kováts-Indizes sowie den massenspektrometrischen Daten der Datenbank NIST 2008 MS LIB.

Tabelle 4.28: Geräteparameter GC-FID.

Gerät	Agilent 7890A
Autosampler	Agilent 7683B Series Injector
Injektor	split/splitless
Detektion	Flammenionisationsdetektor (FID), 250 °C, H <sub>2</sub> : 40 mL min <sup>-1</sup> , Luft: 400 mL min <sup>-1</sup> , N <sub>2</sub> : 25 mL min <sup>-1</sup>
Datenaufnahme	Chemstation B.04.01 (Agilent Technologies)
Säule	HP-InnoWax, 30 m x 0,32 mm ID, Filmdicke 0,25 $\mu\text{m}$ (Agilent Technologies J&W Scientific)
Injektionsvolumen	1 $\mu\text{L}$
Trägergas	H <sub>2</sub> , Vordruck 32,331 kPa, Fluss 2 mL min <sup>-1</sup>
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min <sup>-1</sup> auf 240 °C (12 min)

Tabelle 4.29: Geräteparameter GC-MS.

Gerät	Agilent 7890A
Autosampler	Agilent 7683B Series Injector
Injektor	split/splitless
Splitverhältnis	1/10
Injektionsvolumen	1 µL
Detektion	Agilent 5975 C MSD Triple-Axis-Detektor
Datenaufnahme	MSD Chemstation E.02.00.493
Säule	DB-5, 30 m x 0,25 mm ID, Filmdicke 0,25 µm (Agilent Technologies J&W Scientific)
Trärgas	He, Vordruck 63,07 kPa, Fluss 1,2 mL min <sup>-1</sup>
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min <sup>-1</sup> auf 300 °C (5 min),
Temperaturen	Interface: 250 °C, Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol 150 °C
Ionisation	Ionenstoßionisation: 70 eV
Datenbank	NIST 2008 MS LIB

## 4.9 ELISA

### 4.9.1 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Die für die Beschichtung verwendeten Puffer und Lösungen sind in folgenden Tabellen zusammengefasst (Tabelle 4.30 bis Tabelle 4.38).

Tabelle 4.30: 0,1 M Kaliumacetat-Puffer (KOAc), pH 4,0.

Komponente	Menge
0,2 M Essigsäure	20,5 mL
0,2 M Kaliumacetat	4,5 mL
Reinstwasser	ad 50 mL

Tabelle 4.31: 10 mM Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4.

Komponente	Menge
NaCl	4,00 g
KCl	0,10 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,72 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,12 g
Reinstwasser	ad 500 mL

pH-Einstellung mit 1 M NaOH.

Tabelle 4.32: 0,1 M Natriumcarbonat-Puffer pH 9,5.

Komponente	Menge
$\text{NaHCO}_3$	0,84 g
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	0,38 g
Reinstwasser	ad 100 mL

Tabelle 4.33: Waschpuffer, 10 mM PBST, pH 7,4.

Komponente	Menge
NaCl	16,00 g
KCl	0,40 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	2,88 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,48 g
Tween 20	1 mL
Reinstwasser	ad 2 L

pH-Einstellung mit 1 M NaOH.

Tabelle 4.34: Blockierungsproteinlösung, 1%ige Gelatine.

Komponente	Menge
Blocking Reagent (Roche, Mannheim)	27 g
Reinstwasser	100 mL

Diese Stammlösung (10%ige Gelatine) wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde diese 1:10 mit Reinstwasser verdünnt.

Tabelle 4.35: Blockierungsproteinlösung, 5%iges Milchpulver.

Komponente	Menge
Milchpulver	2,5 g
10 mM PBS, pH 7,4	ad 50 mL

Tabelle 4.36: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Stammlösung.

Komponente	Menge
TMB	120,7 mg
DMSO	ad 10 mL

Auf Grund der Lichtempfindlichkeit von TMB wurde die Lösung in einem lichtundurchlässigen Zentrifugenröhrchen aufbewahrt.

Tabelle 4.37: Färbelösung.

Komponente	Menge
TMB	0,12 mg mL <sup>-1</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,05%
gelöst in 0,05 M Natriumacetat-Lösung, pH 4,5	

Die Lösung wurde vor der Verwendung jeweils frisch angesetzt.

Tabelle 4.38: Rinderserumalbumin (BSA)-Stammlösung.

Komponente	Menge
BSA	50,0 mg
10 mM PBS, pH 7,4	ad 100 mL

Die Stammlösung ( $c = 500,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) wurde im Verhältnis 1:500 mit 10 mM PBS, pH 7,4 verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

#### 4.9.2 Produktion der Antikörper

Die Produktion der gegen Striatal A und B gerichteten Antikörper wurde von der Firma Eurogenetec S.A (Seraing, Belgien) durchgeführt. Als Antigen wurden Striatal A und B im Verhältnis 1/1 (w/w) gemischt. Da es sich bei Striatal A und B um relativ kleine Moleküle handelt, die selbst keine Immunantwort hervorrufen können, wurden sie zunächst an Rinderserumalbumin (BSA) gekoppelt. Mit dem Striatal A/B-BSA-Konjugat erfolgte anschließend die Immunisierung zweier Kaninchen (ID 6928, 6929). Vor der ersten Immunisierung wurde Blut zur Gewinnung des Präimmunserums abgenommen, welches im Rahmen der Etablierung des ELISA als Negativkontrolle diente. Die Immunisierungen und Blutungen erfolgten zu den in Tabelle 4.39 mit x gekennzeichneten Tagen.



Tabelle 4.39: Ablauf der Immunisierung.

Tag	0	14	28	38	56	66	91	101	115
Immunisierung	x	x	x		x		x		
Menge [ $\mu\text{g}$ ] / Kaninchen	200	200	200		200		400		
Blutung	x			x		x		x	x

### 4.9.3 Stabilität von Striatal B in verschiedenen Pufferlösungen

Striatal B wurde als Hapten zur Beschichtung der Mikrotiterplatte ausgewählt, da es polarer als Striatal A ist und somit besser an die Plattenoberfläche adsorbiert. Da Striatal B in wässrigen Lösungen schwer löslich ist, war der Zusatz eines organischen Lösungsmittels bei der Beschichtung der Mikrotiterplatten notwendig. Das organische Lösungsmittel darf dabei weder mit Striatal B reagieren, noch das Plattenmaterial beschädigen. Als geeignetes Lösungsmittel wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) ausgewählt. Um den optimalen pH-Wert des Beschichtungspuffers herauszufinden und die Stabilität des Striatals bei dem entsprechenden pH-Wert zu überprüfen, wurde die Striatal B-Konzentration in DMSO/Puffer (1/1, v/v) mit variierenden pH-Werten nach drei und elf Stunden mittels HPLC analysiert. In Tabelle 4.40 sind die verwendeten Pufferlösungen mit ihren pH-Werten vor und nach der Mischung mit DMSO aufgeführt.

Tabelle 4.40: pH-Werte der Pufferlösungen vor und nach Zugabe von DMSO.

pH Wert vor	Puffer	pH-Wert nach Mischung mit 50% DMSO
1,0	0,1 M HCl	2,74
3,0	KOAc-Puffer	4,85
3,5	KOAc-Puffer	5,29
4,0	KOAc-Puffer	5,77
4,5	KOAc-Puffer	6,25
5,0	KOAc-Puffer	6,73
5,5	KOAc-Puffer	7,29
6,0	KOAc-Puffer	7,81
6,5	KOAc-Puffer	8,33
7,4	PBS-Puffer	9,71
9,5	Na-Carbonat-Puffer	11,14

Die Proben wurden mit einer Konzentration von  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  Striatum B in den unterschiedlichen DMSO/Puffer-Mischungen (1/1, v/v) angesetzt. Die Löslichkeit von Striatum B wurde jeweils visuell überprüft. Nach einer Inkubationszeit von drei bzw. elf Stunden wurden die Proben mittels HPLC analysiert. Als Referenz diente eine Probe von  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  Striatum B in 100% DMSO. Die Parameter der HPLC-Messung sind in den Tabelle 4.15 und Tabelle 4.16 aufgeführt. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich der Signalstärken für Striatum B in der Pufferlösung und der Referenzprobe.

#### 4.9.4 Durchführung des ELISA

Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Durchführung des indirekten ELISA nach folgendem Schema:

**Beschichtung:** Für die Beschichtung der Mikrotiterplatten wurde das Hapten Striatal B in DMSO gelöst und im Verhältnis 1:1 mit Beschichtungspuffer versetzt. Jeweils 100 µL dieser Lösung wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Für eine Positivkontrolle wurden ausgewählte Vertiefungen mit 1 µg mL<sup>-1</sup> BSA beschichtet. Die beschichtete Platte wurde unter Lichtausschluss bei 24 °C für 16 h inkubiert und die Lösung anschließend entfernt.

**Waschschritt:** Um nicht gebundenes Striatal B zu entfernen, wurde die Platte dreimal mit je 300 µL Waschpuffer gewaschen.

**Blockierung:** Zur Blockierung der freien Stellen der Mikrotiterplatte wurden 200 µL Blockierungsproteinlösung in jede Vertiefung pipettiert und für drei Stunden bei 24 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Damit sollte die Bindung der Antikörper an die Plattenoberfläche verhindert werden.

**Waschschritt:** Nicht gebundenes Blockierungsprotein wurde durch dreimaliges Waschen mit je 300 µL Waschpuffer entfernt.

**Präinkubation mit Konkurrenz-molekül:** Bei einem kompetitiven indirekten ELISA wurde eine Präinkubation der primären Antikörper mit den Konkurrenz-molekülen für eine Stunde bei 24 °C im Brutschrank durchgeführt. Bei einem nicht-kompetitiven indirekten ELISA wurde dieser Schritt ausgelassen.

**Reaktion mit primärem Antikörper (PAK):** Für die primärere Antikörperlösung wurde zunächst eine geeignete Verdünnung hergestellt. Je 100 µL der PAK-Lösung wurden anschließend in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und unter Lichtausschluss für eine Stunde inkubiert. Das Serum vor der Immunisierung diente als Negativkontrolle. Bei einem kompetitiven indirekten ELISA wurden anstelle der PAK die präinkubierten primären Antikörper verwendet.

**Waschschritt:** Um nicht gebundene PAK zu entfernen, erfolgte ein weiterer Waschschritt mit Waschpuffer (3 x 300 µL pro Vertiefung).

**Reaktion mit sekundärem Antikörper (SAK):** Je 100  $\mu\text{L}$  der 1:5000 verdünnten SAK-Lösung (Goat Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate, Merck) wurden in jede Vertiefung pipettiert und für eine Stunde unter Lichtausschluss inkubiert.

**Waschschritt:** Überschüssige SAK wurden durch viermaliges Waschen mit je 300  $\mu\text{L}$  Waschpuffer pro Vertiefung entfernt. Die Einwirkzeit der Waschlösung betrug jeweils 5 min.

**Farbreaktion:** Je 100  $\mu\text{L}$  der Chromogenlösung wurden in jede Vertiefung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min unter Lichtausschluss wurde die Reaktion durch die Zugabe von je 100  $\mu\text{L}$  0,5 M Schwefelsäure pro Kavität gestoppt.

**Messung:** Die Extinktion wurde mittels Mikrotiterplattenleser bei 450 und 630 nm gemessen.

**Auswertung:** Bei allen Versuchen wurden Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen durchgeführt. Für die Auswertung wurde die Differenz der Extinktion ( $E_{450}-E_{630}$ ) verwendet und die Diagramme wurden mit Microsoft<sup>®</sup>-Excel erstellt.

#### **4.9.5 Lagerstabilität der beschichteten und blockierten Mikrotiterplatten**

Die Mikrotiterplatten wurden mit 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Striatal B für 16 h bei 24 °C beschichtet und drei Stunden mit 1%iger Gelatine blockiert. Anschließend wurden die Platten mit Alufolie verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt. Nach 2, 6, 10 und 16 Tagen wurden die Platten weiter, wie unter 4.9.4 beschrieben, vermessen. Als Referenz dienten die Werte der Platten, die nach dem Blockierungsschritt unmittelbar weiter bearbeitet wurden (Tag 0).

#### 4.9.6 Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln in einem kompetitiven ELISA

Für die Entwicklung eines kompetitiven ELISA war es notwendig zu überprüfen, inwieweit die Antigen-Antikörper-Reaktion durch organische Lösungsmittel wie z. B. DMSO, Acetonitril und Methanol beeinflusst wird. Dafür wurde eine Maxisorp Mikrotiterplatte über Nacht bei 24 °C mit 5 µg mL<sup>-1</sup> Striatal B in DMSO/PBS-Puffer pH 7,4 (1:1) beschichtet. Der primäre Antikörper wurde im Verhältnis 1:200 mit PBST mit 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 40% Lösungsmittel-Zusatz verdünnt und vor dem Auftragen auf die Mikrotiterplatte für eine Stunde bei 24 °C im Brutschrank präinkubiert. Proben ohne Lösungsmittel-Zusatz dienten als Referenz.

#### 4.9.7 Spezifität / Kreuzreaktivität

Für die Bestimmung der Kreuzreaktivität der strukturähnlichen Verbindungen wurde der indirekt kompetitive ELISA verwendet. 5% DMSO bzw. 5% ACN wurden bei der Präinkubation zugesetzt, um die Löslichkeit der Konkurrenz-moleküle zu erhöhen. Die Konzentration der Konkurrenz-moleküle sowie der Kalibrierlösung (Striatal B) betrug 0,0003 bis 20 µg mL<sup>-1</sup>.

Für die Auswertung wurde ein %  $B/B_0$  -Wert berechnet (Formel 4.3).

$$\% \frac{B}{B_0} = \frac{\Delta E - \Delta E_{\text{excess}}}{\Delta E_0 - \Delta E_{\text{excess}}} \quad \text{Formel 4.3}$$

Mit:

$\Delta E$ : Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm der Probe

$\Delta E_{\text{excess}}$ : Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm der unteren Asymptote

$\Delta E_0$ : Extinktionsdifferenz zwischen 450 nm und 630 nm der oberen Asymptote

Die %  $B/B_0$ -Werte (y-Achse) wurden grafisch gegen die Konzentration (x-Achse) aufgetragen. Bei logarithmischer Darstellung der x-Achse sollte eine sigmoide Kurve resultieren (Abbildung 2.55 (A)). Zur bessere Darstellung und Bestimmung

der Probenkonzentration wurde die sigmoide Kurve durch eine Logit-Funktion linearisiert (Formel 4.4).

$$\text{logit } (\% B/B_0) = \ln \left( \frac{\% B/B_0}{100 - \% B/B_0} \right) \quad \text{Formel 4.4}$$

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität wurde die  $IC_{50}$  (die Konzentration eines Konkurrenz-moleküls, bei der eine 50%ige Inhibierung beobachtet wird) verwendet, die nach Formel 4.5 berechnet wurde.

$$\% IC_{50} = \frac{A}{B} \times 100 \quad \text{Formel 4.5}$$

Mit:

A: Konzentration von Striatal B bei  $\text{logit } (\% B/B_0) = 0$ , d.h.  $\% B/B_0 = 50\%$

B: Konzentration des Konkurrenz-moleküls bei  $\text{logit } (\% B/B_0) = 0$ , d. h.  $\% B/B_0 = 50\%$

#### 4.9.8 Wiederfindung

Da der ELISA auf Rohextrakte der Kulturüberstände angewendet wurde, wurde Ethylacetat-Rohextrakt aus 20 mL Kulturmedium ohne *H. erinaceus* hergestellt, in 1 mL Acetonitril aufgenommen und diese als Probenmatrix für die Wiederfindungsversuche verwendet. Striatal B wurde dieser Probenmatrix in verschiedenen Konzentrationen (10,01, 5,005, 2,002, 1,001, 0,501, 0,400, 0,200, 0,020 und 0,001  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) zugesetzt und analysiert. Anhand einer Kalibrierreihe wurde die Probenkonzentration berechnet. Die Wiederfindung erfolgt nach Formel 4.6.

$$\text{Wiederfindung } [\%] = \frac{\text{gemessene Konzentration}}{\text{eingesetzte Konzentration}} \times 100 \quad \text{Formel 4.6}$$

Die dotierten Proben wurden auch mittels HPLC-DAD vermessen und ihre Konzentrationen aus einer Kalibriergerade von Striatal B ( $y = 9402,7x - 1182,8$ ,  $R^2 = 0,9999$ ,  $0,40 \sim 50,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) errechnet, um eine Korrelation mit dem ELISA darstellen zu können.

Die Nachweisgrenze ergab sich aus der Konzentration, die gerade noch auswertbar war. Die Bestimmungsgrenze ergab sich aus der Konzentration, die aus dem linearen Bereich einer Kalibrierfunktion abgeschätzt war.

#### **4.9.9 Analyse der Kulturüberstände von *H. erinaceus***

Die Kulturüberstände aus den Submerskulturen von *H. erinaceus* über neun Tage Kultivierung wurden mittels indirektem kompetitivem ELISA analysiert. Alle verwendeten Kulturüberstände wurden zunächst zentrifugiert (14.000 rpm, 18080 g, 24°C, 1 min), um Zellbestandteile zu entfernen. Das Probenvolumen für die Präinkubation setzte sich aus 5% Kulturüberstand, 5% DMSO und Primärantikörper (1:200 verdünnt) in PBST zusammen (Tabelle 4.41). Als Kontrolle diente das Kulturmedium ohne Pilz.

Die Ethylacetatextrakte (20 mL Kulturüberstände aus den Submerskulturen wurden mit 20 mL Ethylacetat extrahiert und 15 mL der Ethylacetatphase wurden bis zur Trockne eingeeengt und anschließend in 1 mL Acetonitril wieder aufgenommen) aus Submerskulturen von *H. erinaceus* über neun Tage, die zuvor mittels HPLC-DAD und HPTLC analysiert worden waren (2.2.2.3), wurden mittels indirektem kompetitivem ELISA analysiert. Das Probenvolumen für die Präinkubation setzte sich in diesem Fall aus 0,5% Extrakt, 4,5% Acetonitril und Primärantikörper (1:200 verdünnt) in PBST zusammen (Tabelle 4.41). Als Kontrolle diente durch Ethylacetat extrahiertes Kulturmedium ohne Pilz.

Tabelle 4.41: Pipettierschema für eine Probe zur Präinkubation (1 mL Ansatz).

	Kulturüberstand	Ethylacetatextrakt
Probe [ $\mu\text{L}$ ]	50	5
DMSO [ $\mu\text{L}$ ]	50	-
ACN [ $\mu\text{L}$ ]	-	45
PBST [ $\mu\text{L}$ ]	400	450
1:100 Primärantikörper in PBST * [ $\mu\text{L}$ ]	500	500
Gesamtvolumen [ $\mu\text{L}$ ]	1000	1000

\* Die Lösung der Primärantikörper wurde vor dem Gebrauch stets frisch in einem Messkolben angesetzt.

#### 4.9.10 Analyse der Extrakte aus Fruchtkörpern von *H. erinaceus*

Der Ethylacetat-Rohextrakt aus Fruchtkörpern von *H. erinaceus* wurde in Acetonitril mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  angesetzt. Die Präinkubationslösung setzte sich aus 5% Acetonitril, Primärantikörper (1:200 verdünnt) und Rohextrakt mit verschiedenen Konzentrationen (50,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,0 und  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) in PBST zusammen. Die Präinkubationslösungen mit verschiedenen Rohextrakt-Konzentrationen wurden wie folgt angesetzt:

1.  $100 \mu\text{L}$  des Rohextraktes ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) +  $900 \mu\text{L}$  PBST  $\rightarrow 100 \mu\text{g mL}^{-1}$  Rohextrakt in Acetonitril/PBST (1/9, v/v), *Lösung 1*.
2. Verdünnen der *Lösung 1* mit Acetonitril/PBST (1/9, v/v) auf die Konzentrationen 20, 10, 5, 2 und  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (500  $\mu\text{L}$  Ansatz).
3. Zugabe von gleichem Volumen der Primärantikörper (1:100 verdünnt in PBST).

Als Kontrolle diente Acetonitril ohne Rohextrakt.



## 4.10 Sequenzierung genomischer DNA

### 4.10.1 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung der genomischen DNA wurde der NucleoSpin® Plant II Kit (Macherey Nagel; Handbuch Dezember 2010/Rev.05) genutzt. 100 mg Mycel der Submerskultur bzw. des Fruchtkörpers von *H. erinaceus* wurden mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und zu Pulver gemörsert. Die weiteren Arbeitsschritte wurden gemäß dem Herstellerhandbuch durchgeführt. Die DNA-haltige Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Mit Hilfe eines NanoPhotometers (Lid 10/1 mm) wurde die Konzentration der isolierten DNA ermittelt.

### 4.10.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Gewünschte DNA-Abschnitte zwischen zwei Oligonukleotidprimern wurden mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten ITS-Primer sind in Tabelle 4.42 dargestellt.

#### PCR-Ansatz

5 µL DNA Template

18,85 µL RNase-freies Wasser,

3 µL *Coral Load* PCR-Puffer,

0,6 µL 10 mM dNTPs,

1,2 µL 10 µM ITS5 fwd (10 µM) (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

1,2 µL 10 µM ITS4 rvd (10 µM) (Eurofins MWG Operon)

0,15 µL Taq-Polymerase (Hotstar Hifi, Qiagen, Hilden, 2,5 Units µL<sup>-1</sup>)

In Summe 30 µL Ansatz

Tabelle 4.42: ITS-Primer zur Amplifizierung der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit ITS-Bereich.

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
1473	ITS4	5'->TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC<3'	58 °C
1474	ITS5	5'->GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG<3'	58 °C

### Cycler-Programm

Aktivierung der Taq bei 95 °C für 8 min

30 Zyklen:

Denaturierung bei 95 °C für 1 min

Annealing bei 53 °C für 1 min

Elongation bei 72 °C für 1 min

Bei 72 °C für 5 min halten

Kühlen auf 4 °C

## **4.10.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Die PCR-Amplifikate wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt. Folgende Lösungen wurden dafür eingesetzt.

### 50x TAE-Puffer

Tris	242 g L <sup>-1</sup>
Essigsäure-Konzentration	57,1 mL L <sup>-1</sup>
0,5 M EDTA, pH 8	100,0 mL L <sup>-1</sup>

Der 50 x TAE-Puffer wurde vor der Verwendung 1:50 mit VE-Wasser verdünnt.

1,0 - 1,6% Agarose wurden in 1 x TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Pro 10 mL Lösung wurden nach Abkühlen auf ca. 60 °C 1 µL 1%ige Ethidiumbromidlösung hinzupipettiert und das Gel in eine Vorrichtung mit eingehängtem Kamm gegossen. Die PCR Proben wurden mit dem *Coral Load* PCR-Puffer direkt auf das Gel aufgetragen. Die Gelkammer wurde mit 1 x TAE-Puffer befüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V. Die Fragmentgrößen wurden anhand eines Größenstandards (100 bp DNA erweiterte DNA-Leiter für PCR-Amplifikate, 1 kbp DNA-Leiter für Restriktionsverdau, Roth) abgeschätzt. Zur Geldokumentation wurde eine Anlage der Firma Decon Science Tec verwendet, die mit einem UV-Transilluminator (312 nm), einer Kamera und der Software DeVision G Vers. 2.0 ausgestattet ist.

#### **4.10.4 Extraktion der genomischen DNA**

Die relevanten DNA-Fragmente wurden unter Belichtung bei 312 nm aus dem Gel ausgeschnitten. Für die Extraktion der genomischen DNA aus dem Gel wurde das Kit NucleoSpin® Extract II (Macherey Nagel, Handbuch April 2008) verwendet. Die DNA-Konzentration wurde nach Gelextraktion mit Hilfe eines NanoPhotometers bestimmt. Die Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins MWG durchgeführt.



## 5     **Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Sekundärmetabolite aus der Submerskultivierung von Basidiomyceten untersucht. Bei der Medienoptimierung wurden verschiedene Substrate für eine optimale Erinacinproduktion von *H. erinaceus* getestet. Hier könnte eine weitere Medienoptimierung durchgeführt werden, wie z. B. die verschiedenen Kohlenstoffquellen im Medium 6 zu vereinfachen. Auch die optimale Konzentration der Stickstoffquellen könnte untersucht werden. Weitere denkbare Maßnahmen zur Konzentrationssteigerung der Erinacine sind z. B. durch Coinkubation mit Bakterien, durch zeitliche Zufütterung von Substraten, durch Variation des C/N-Verhältnisses, durch Zugabe von biogenetischen Vorstufen oder durch Temperatur und pH-Einstellung. Strahlung mit anderen Wellenlängen und verschiedene Lichtintensitäten könnten getestet werden. Da ein großes Interesse der Pharma-Industrie an Naturstoffen wie Erinacinen besteht, sollte eine Maßstabvergrößerung untersucht werden. Ein geeigneter Downstreaming Prozess zur biotechnologischen Gewinnung von Cyathane-Diterpenoiden sollte dabei untersucht und optimiert werden.

Mittels MALDI-MS-Imaging konnte eine Lokalisierung der Sekundärmetabolite von *H. erinaceus* in den Pellets nachgewiesen werden. Jedoch reichte die Massenauflösung nicht aus, um die isomeren Metabolite zu differenzieren. Mit Hilfe der Tandem MS in Kombination mit MALDI-Imaging könnte diese Differenzierung gelingen. Des Weiteren könnte die Auflösung vergrößert werden, um die Analyse der Zielsubstanzen auf subzellulärer Ebene zu ermöglichen.

Bisher konnten nur qualitative bzw. halbquantitative Aussagen mittels HPTLC getroffen werden. Grundsätzlich ist diese Methode aber auch zur Quantifizierung geeignet. Hierfür müssten weitere Untersuchungen hinsichtlich der Sensitivität, der Nachweisgrenzen und Wiederfindungsraten durchgeführt werden. Auch die Kopplung der HPTLC mit der NMR zur Identifizierung von Strukturelementen müsste weiter optimiert werden. Durch breiter aufgetragene Banden könnte die eingetragene Substanzmenge erhöht werden.

Der entwickelte ELISA kann als eine Screeningmethode zur Detektion der Cyathan-Diterpenoide eingesetzt werden. Damit lassen sich neue Cyathane bzw. neue Produzenten dieser Stoffklasse entdecken.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abang, M. M., W. R. Abraham, R. Asiedu, P. Hoffmann, G. Wolf, S. Winter (2009): Secondary metabolite profile and phytotoxic activity of genetically distinct forms of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea spp.*). *Mycol Res* 113, 2009, S. 130–140.
- Adhami, H. R., U. Scherer, H. Kaehlig, T. Hettich, G. Schlotterbeck, E. Reich, L. Krenn (2013): Combination of bioautography with HPTLC-MS/NMR: A Fast Identification of acetylcholinesterase Inhibitors from galbanum. *Phytochem Analysis* 2013.
- Agger, S., F. Lopez-Gallego, C. Schmidt-Dannert (2009): Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Mol Microbiol* 72, 2009, S. 1181–1195.
- Alarcon, J., S. Aguila (2006): Lovastatin production by *Pleurotus ostreatus*: effects of the C:N ratio. *Z Naturforsch* 61, 2006, S. 95–98.
- Alarcon, J., S. Aguila, P. Arancibia-Avila, O. Fuentes, E. Zamorano-Ponce, M. Hernandez (2003): Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycetes) strains. *Z Naturforsch* 58, 2003, S. 62–64.
- Alberts, A. W. (1988): Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am J Cardiol* 62, 1988, S. 10J-15J.
- Alberts, A. W., J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Albers-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch, J. Springer (1980): Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *P Natl Acad Sci USA* 77, 1980, S. 3957–3961.
- Allbutt, A. D., W. A. Ayer, H. J. Brodie, B. N. Johri, H. Taube (1971): Cyathin, a new antibiotic complex produced by *Cyathus helenae*. *Can J Microbiol* 17, 1971, S. 1401–1407.
- Amstalden van Hove, E. R., T. R. Blackwell, I. Klinkert, G. B. Eijkel, R. M. A. Heeren, K. Glunde (2010): Multimodal mass spectrometric imaging of small molecules reveals distinct spatio-molecular signatures in differentially metastatic breast tumor models. *Cancer Res* 70, 2010, S. 9012–9021.

- Anderson, D. M. G., V. A. Carolan, S. Crosland, K. R. Sharples, M. R. Clench (2009): Examination of the distribution of nicosulfuron in sunflower plants by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging. *Rapid Commun Mass Sp* 23, 2009, S. 1321–1327.
- Andriianova, D. A., G. P. Smirnova, A. S. Shashkov, A. O. Chizhov, L. A. Galanina, E. P. Feofilova, A. I. Usov (2011): Polysaccharide composition of mycelium and cell walls of the fungus *Penicillium roqueforti*. *Bioorg Khim* 37, 2011, S. 399–407.
- Anke, T., F. Oberwinkler (1977): The striatins--new antibiotics from the basidiomycete *Cyathus striatus* (Huds. ex Pers.) Willd. *J Antibiot* 30, 1977, S. 221–225.
- Anke, T., U. Rabe, P. Schu, T. Eizenhöfer, M. Schrage, W. Steglich (2002): Studies on the biosynthesis of striatal-type diterpenoids and the biological activity of herical. *Z Naturforsch C* 57, 2002, S. 263–271.
- Arnoldi, E. (1990): HPLC-Analytik und Fermentationsanalyse des Pilzes *Cyathus striatus*. Diss., Universität Kaiserslautern, Deutschland.
- Arnone, A., R. Cardillo, G. Nasini, O. V. de Pava (1991): Secondary mould metabolites. Part 31. Isolation and structure elucidation of illudins A and B, and illudalenol, new sesquiterpenoids from *Clitocybe illudens*. *J Chem Soc Perk T* 1, 1991, S. 733–737.
- Ayer, W. A., L. M. Browne (1981): Terpenoid metabolites of mushrooms and related basidiomycetes. *Tetrahedron* 37, 1981, S. 2197–2248.
- Ayer, W. A., S. P. Lee (1979): Metabolites of bird's nest fungi. Part 11. Diterpenoid metabolites of *Cyathus earlei* Lloyd. *Can J Chemistry* 57, 1979, S. 3332–3337.
- Ayer, W. A., S. P. Lee, T. T. Nakashima (1979): Metabolites of bird's nest fungi. Part 12. Studies on the biosynthesis of the cyathins. *Can J Chemistry* 57, 1979, S. 3338–3343.
- Ayer, W. A., H. Taube (1972): Metabolites of *Cyathus helenae*. cyathin A<sub>3</sub> and allocyathin B<sub>3</sub>, members of a new group of diterpenoids. *Tetrahedron Lett* 13, 1972, S. 1917–1920.
- Bartholow, M. (2012): Top 200 Drugs of 2011. *Pharmacy Times* 78, 2012. Abrufbar unter: <http://www.pharmacytimes.com/publications/issue/2012/July2012/Top-200-Drugs-of-2011>. 21.05.2013.
- Bayram, O., S. Krappmann, M. Ni, J. W. Bok, K. Helmstaedt, O. Valerius, S. Braus-Stromeier, N. J. Kwon, N. P. Keller, J. H. Yu, G. H. Braus (2008): VelB/VeA/LaeA Complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 2008, S. 1504–1506.



- Bhand, S., I. Surugiu, A. Dzgoev, K. Ramanathan, P. V. Sundaram, B. Danielsson (2005): Immuno-arrays for multianalyte analysis of chlorotriazines. *Talanta* 65, 2005, S. 331–336.
- Blaze M. T., M., B. Aydin, R. P. Carlson, L. Hanley (2012): Identification and imaging of peptides and proteins on *Enterococcus faecalis* biofilms by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Analyst* 137, 2012, S. 5018–5025.
- Böker, A., M. Fischer, R. G. Berger (2001): Raspberry ketone from submerged cultured cells of the basidiomycete *Nidula niveo-tomentosa*. *Biotechnol Progr* 17, 2001, S. 568–572.
- Böker, R. (1990): Untersuchungen zu Wirkstoffsynthesen und Fermentationen an *P. atropurpurascens* und *Cyathus striatus* (Basidiomycetes). Diss., Universität Kaiserslautern, Deutschland.
- Bömke, C., B. Tudzynski (2009): Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry* 70, 2009, S. 1876–1893.
- Boudet, F., J. Theze, M. Zouali (1991): UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J Immunol Methods* 142, 1991, S. 73–82.
- Bowman, S. M., S. J. Free (2006): The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28, 2006, S. 799–808.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 1976, S. 248–254.
- Brock, P. M., H. Doring, M. I. Bidartondo (2009): How to know unknown fungi: the role of a herbarium. *New Phytol* 181, 2009, S. 719–724.
- Brun, E. M., M. Garcés-García, R. Puchades, Á. Maquieira (2004): Enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus insecticide fenthion. Influence of hapten structure. *J Immunol Methods* 295, 2004, S. 21–35.
- Bud, R. (2007): *Penicillin. Triumph and tragedy*. Oxford University Press, Oxford;, New York. ISBN: 978-0-19-925406-4.
- Chisti, Y., M. Moo-Young (1986): Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microb Tech* 8, 1986, S. 194–204.
- Corrochano, L. M. (2007): Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photoch Photobio Sci* 6, 2007, S. 725–736.

- Dankwardt, A., J. Müller, B. Hock (1998): Stabilization of enzyme immunoassays for atrazine. *Anal Chim Acta* 362, 1998, S. 35–45.
- Daum, R. S., S. Kar, P. Kirkpatrick (2007): Retapamulin. *Nat Rev Drug Discov* 6, 2007, S. 865–866.
- Deutsches Ernährungsberatungs- und Informationsnetz (2013): Inhaltsstoffe von Hafermehl. Abrufbar unter <http://www.ernaehrung.de/lebensmittel/de/C233000/Hafer-Mehl.php>. 21.03.2013.
- Disch, A. (1998): On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 168, 1998, S. 201–208.
- Dixon, E., T. Schweibenz, A. Hight, B. Kang, A. Dailey, S. Kim, M.Y. Chen, Y. Kim, S. Neale, A. Groth, T. Ike, S. Khan, B. Schweibenz, D. Lieu, D. Stone, T. Orellana, R. Couch (2011): Bacteria-induced static batch fungal fermentation of the diterpenoid cyathin A<sub>3</sub>, a small-molecule inducer of nerve growth factor. *J Ind Microbiol Biot* 38, 2011, S. 607–615.
- Dodig, S. (2009): Interferences in quantitative immunochemical methods. *Biochem Medica* 1, 2009, S. 50–62.
- Doucha, J., K. Livansky (2008): Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Appl Microbiol Biot* 81, 2008, S. 431–440.
- Drège, E., G. Morgant, D. Desmaële (2005): Asymmetric synthesis of the tricyclic core of cyathin diterpenoids via intramolecular Heck reaction. *Tetrahedron Lett* 46, 2005, S. 7263–7266.
- Ehlers, S., W. H. Schnitzler (1998): Submerged culture of *Hericium erinaceus*. *Angew Bot* 72, 1998, S. 168–173.
- Eisenreich, W., B. Menhard, P. J. Hylands, M. H. Zenk, A. Bacher (1996): Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *P Natl Acad Sci USA* 93, 1996, S. 6431–6436.
- Eisenreich, W., M. Schwarz, A. Cartayrade, D. Arigoni, M. H. Zenk, A. Bacher (1998): The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem Biol* 5, 1998, S. R221–R233.
- Endo, A., M. Kuroda, K. Tanzawa (1976a): Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett* 72, 1976, S. 323–326.

- Endo, A., M. Kuroda, Y. Tsujita (1976b): ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. J Antibiot 29, 1976, S. 1346–1348.
- Engels, B., U. Heinig, T. Grothe, M. Stadler, S. Jennewein (2011): Cloning and characterization of an *Armillaria gallica* cDNA encoding protoilludene synthase, which catalyzes the first committed step in the synthesis of antimicrobial melleolides. J Biol Chem 286, 2011, S. 6871–6878.
- Enquist, J. A., B. M. Stoltz (2009): Synthetic efforts toward cyathane diterpenoid natural products. Nat Prod Rep 26, 2009, S. 661–680.
- Enquist, J. A., S. C. Virgil, B. M. Stoltz (2011): Total syntheses of cyanthiwigins B, F, and G. Chem Eur J 17, 2011, S. 9957–9969.
- Erjavec, J., J. Kos, M. Ravnikar, T. Dreo, J. Sabotič (2012): Proteins of higher fungi – from forest to application. Trends Biotechnol 30, 2012, S. 259–273.
- Fang, S. T., T. Feng, L. Zhang, Z. J. Dong, Z. H. Li, J. K. Liu (2011): Cyathane diterpenoids from fruiting bodies of *Phellodon niger*. Nat Prod Bioprospect 1, 2011, S. 37–40.
- Fang, S. T., L. Zhang, Z. H. Li, B. Li, J. K. Liu (2010): Cyathane diterpenoids and nitrogenous terphenyl derivative from the fruiting bodies of basidiomycete *Phellodon niger*. Chem Pharm Bull 58, 2010, S. 1176–1179.
- Fellermeier, M., M. Raschke, S. Sagner, J. Wungsintaweeikul, C. A. Schuhr, S. Hecht, K. Kis, T. Radykewicz, P. Adam, F. Rohdich, W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, M. H. Zenk (2001): Studies on the nonmevalonate pathway of terpene biosynthesis. The role of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in plants. Eur J Biochem 268, 2001, S. 6302–6310.
- Feng, Y., B. Ning, P. Su, H. Wang, C. Wang, F. Chen, Z. Gao (2009): An immunoassay for bisphenol A based on direct hapten conjugation to the polystyrene surface of microtiter plates. Talanta 80, 2009, S. 803–808.
- Firer, M., T. Spivak, Y. Shoenfeld, H. Slor (1991): The effects of incubation temperature and coating procedure on the measurement of antibodies to cardiolipin. J Immunol Methods 143, 1991, S. 31–39.
- Fleming, A. (1929): On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Brit J Exp Pathol 10, 1929, S. 226–236.
- Fraatz, M. A., R. G. Berger, H. Zorn (2009a): Nootkatone - a biotechnological challenge. Appl Microbiol Biot 83, 2009, S. 35–41.

- Fraatz, M. A., S. J. Riemer, R. Stöber, R. Kaspera, M. Nimtz, R. G. Berger, H. Zorn (2009b): A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. *J Mol Catal* 61, 2009, S. 202–207.
- Fujiwara, K., T. Kitagawa (1993): A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for spermidine using glutaraldehyde coupling of the hapten to carrier-coated microtiter plates. *J Biochem* 114, 1993, S. 708–713.
- Gang, J., L. Lan, C. Liu (2008): Study on the liquid cultivation conditions of edible mushroom mycelia. *Sprache Chinesische*. Shengwu Jishu 18, 2008, S. 67–69.
- Geerligs, H. J., W. J. Weijer, W. Bloemhoff, G. W. Welling, S. Welling-Wester (1988): The influence of pH and ionic strength on the coating of peptides of herpes simplex virus type 1 in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 106, 1988, S. 239–244.
- Gehrig, I. (1996): Einfluss morphologischer und rheologischer Eigenschaften auf das Produktionsverhalten des Basidiomyceten *Cyathus striatus*. Diss., Universität Kaiserslautern, Deutschland.
- Gerde, J. A., M. Montalbo-Lomboy, L. Yao, D. Grewell, T. Wang (2012): Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technol* 125, 2012, S. 175–181.
- Gonzalez Del Val, A., G. Platas, F. Arenal, J. C. Orihuela, M. Garcia, P. Hernandez, I. Royo, N. de Pedro, L. L. Silver, K. Young, M. F. Vicente, F. Pelaez (2003): Novel illudins from *Coprinopsis episcopalis* (syn. *Coprinus episcopalis*), and the distribution of illudin-like compounds among filamentous fungi. *Mycol Res* 107, 2003, S. 1201–1209.
- Gössi, A., U. Scherer, G. Schlotterbeck (2012): Thin-layer chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy – A versatile tool for pharmaceutical and natural products analysis. *Chimia* 66, 2012, S. 347–349.
- Greer, T., R. Sturm, L. Li (2011): Mass spectrometry imaging for drugs and metabolites. *J Proteomics* 74, 2011, S. 2617–2631.
- Güll, I., M. Wirth, F. Gabor (2007): Development of a sensitive and reliable ELISA for quantification of wheat germ agglutinin. *J Immunol Methods* 318, 2007, S. 20–29.
- Habermehl, G., P. E. Hammann, H. C. Krebs, W. Ternes (2008): *Naturstoffchemie. Eine Einführung; mit 48 Tabellen*. ISBN: 3-540-73732-4. Springer, Berlin; Heidelberg. S. 1–4.
- Halim, R., R. Harun, M. K. Danquah, P. A. Webley (2012): Microalgal cell disruption for biofuel development. *Appl Energ* 91, 2012, S. 116–121.

- Hallenberg, N., R. H. Nilsson, G. Robledo (2013): Species complexes in *Hericium* (Russulales, Agaricomycota) and a new species - *Hericium rajchenbergii* - from southern South America. *Mycol Prog* 12, 2013, S. 413–420.
- Hampel, D., A. Mosandl, M. Wüst (2006): Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in strawberry fruits and foliage:  $^2\text{H}$  labeling studies. *J Agr Food Chem* 54, 2006, S. 1473–1478.
- Hardy, E., M. Ohlin, M. Llano (1994): Enhanced ELISA sensitivity using TCA for efficient coating of biologically active lipopolysaccharides or lipid A to the solid phase. *J Immunol Methods* 176, 1994, S. 111–116.
- Hecht, H. J., G. Höfle, W. Steglich, T. Anke, F. Oberwinkler (1978): Striatin A, B, and C: novel diterpenoid antibiotics from *Cyathus striatus*; X-ray crystal structure of striatin A. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1978, S. 665–666.
- Heim, A., U. Kamionowska, M. Solecki (2007): The effect of microorganism concentration on yeast cell disruption in a bead mill. *J Food Eng* 83, 2007, S. 121–128.
- Hirai, N., R. Yoshida, Y. Todoroki, H. Ohgashi (2000): Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Biosci Biotech Bioch* 64, 2000, S. 1448–1458.
- Ho, C. W., W. S. Tan, W. B. Yap, T. C. Ling, B. T. Tey (2008): Comparative evaluation of different cell disruption methods for the release of recombinant hepatitis B core antigen from *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioproc E* 13, 2008, S. 577–583.
- Hofstetter, O., H. Hofstetter, D. Then, V. Schurig, B. S. Green (1997): Direct binding of low molecular weight haptens to ELISA plates. *J Immunol Methods* 210, 1997, S. 89–92.
- Holthues, H., U. Pfeifer-Fukumura, I. Sound, W. Baumann (2005): Evaluation of the concept of heterology in a monoclonal antibody-based ELISA utilizing direct hapten linkage to polystyrene microtiter plates. *J Immunol Methods* 304, 2005, S. 68–77.
- Huang, M. Z., S. C. Cheng, S. S. Jhang, C. C. Chou, C. N. Cheng, J. Shiea, I. A. Popov, E. N. Nikolaev (2012): Ambient molecular imaging of dry fungus surface by electrospray laser desorption ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom* 325–327, 2012, S. 172–182.
- Inchausti, A., G. Yaluff, A. Rojas de Arias, S. Torres, M. E. Ferreira, H. Nakayama, A. Schinini, K. Lorenzen, T. Anke, A. Fournet (1997): Leishmanicidal and trypanocidal activity of extracts and secondary metabolites from basidiomycetes. *Phytother Res* 11, 1997, S. 193–197.

- Jacobs, M. R. (2007): Retapamulin: a semisynthetic pleuromutilin compound for topical treatment of skin infections in adults and children. *Future Microbiol* 2, 2007, S. 591–600.
- Jaeger, R. J. R., M. Lamshöft, S. Gottfried, M. Spiteller, P. Spiteller (2013): HR-MALDI-MS imaging assisted screening of  $\beta$ -carboline alkaloids discovered from *Mycena metata*. *J Nat Prod* 76, 2013, S. 127–134.
- Jahn, C., H. Zorn, A. Petersen, W. Schwack (1999): Structure-specific detection of plant cuticle bound residues of chlorothalonil by ELISA. *Pestic Sci* 55, 1999, S. 1167–1176.
- Jones, G., M. Wortberg, B. D. Hammock, D. M. Rocke (1996): A procedure for the immunoanalysis of samples containing one or more members of a group of cross-reacting analytes. *Anal Chim Acta* 336, 1996, S. 175–183.
- Jork, H. (1990): Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods. ISBN: 3-527-27834-6. VCH, Weinheim.
- Jury, D. R., D. J. Mikkelsen, P. J. Dunn (1990): Prozone effect and the immunoturbidimetric measurement of albumin in urine. *Clin Chem* 36, 1990, S. 1518–1519.
- Kastner, S., H. Kandler, K. Hotz, M. Bleisch, C. Lacroix, L. Meile (2010): Screening for mycotoxins in the inoculum used for production of attiéké, a traditional Ivorian cassava product. *LWT-Food Sci Technol* 43, 2010, S. 1160–1163.
- Kaur, J. (2004): Strategies for direct attachment of hapten to a polystyrene support for applications in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Anal Chim Acta* 506, 2004, S. 133–135.
- Kaur, J., R. C. Boro, N. Wangoo, K. R. Singh, C. R. Suri (2008): Direct hapten coated immunoassay format for the detection of atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides. *Anal Chim Acta* 607, 2008, S. 92–99.
- Kavanagh, F., A. Hervey, W. J. Robbins (1951): Antibiotic substances from basidiomycetes: VIII. *Pleurotus multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus Passeckerianus* Pilat. *P Natl Acad Sci USA* 37, 1951, S. 570–574.
- Kawagishi, H., A. Masui, S. Tokuyama, T. Nakamura (2006): Erinacines J and K from the mycelia of *Heridium erinaceum*. *Tetrahedron* 62, 2006, S. 8463–8466.
- Kawagishi, H., A. Shimada, S. Hosokawa, H. Mori, H. Sakamoto, Y. Ishiguro, S. Sakemi, J. Bordner, N. Kojima, S. Furukawa (1996a): Erinacines E, F, and G, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Heridium erinaceum*. *Tetrahedron Lett* 37, 1996, S. 7399–7402.

- Kawagishi, H., A. Shimada, R. Shirai, K. Okamoto, F. Ojima, H. Sakamoto, Y. Ishiguro, S. Furukawa (1994): Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett* 35, 1994, S. 1569–1572.
- Kawagishi, H., A. Simada, K. Shizuki, H. Mori, K. Okamoto, H. Sakamoto, S. Furukawa (1996b): Erinacine D, a stimulator of NGF-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Heterocycl Commun* 2, 1996, S. 51–54.
- Kawagishi, H., C. Zhuang (2008): Compounds for dementia from *Hericium erinaceum*. *Drug Future* 33, 2008, S. 149–155.
- Kenji, O., C. Mieko, I. Fumi, H. Tsutomu, Y. Hideshi (2002): Production of  $\gamma$ -lactones by the brown-rot basidiomycete *Piptoporus soloniensis*. *J Biosci Bioeng* 94, 2002, S. 182–185.
- Kenmoku, H., T. Sassa, N. Kato (2000): Isolation of erinacine P, a new parental metabolite of cyathane-xylosides, from *Hericium erinaceum* and its biomimetic conversion into erinacines A and B. *Tetrahedron Lett* 41, 2000, S. 4389–4394.
- Kenmoku, H., N. Kato, M. Shimada, M. Omoto, A. Mori, W. Mitsuhashi, T. Sassa (2001): Isolation of (–)-cyatha-3,12-diene, a common biosynthetic intermediate of cyathane diterpenoids, from an erinacine-producing basidiomycete, *Hericium erinaceum*, and its formation in a cell-free system. *Tetrahedron Lett* 42, 2001, S. 7439–7442.
- Kenmoku, H., T. Shimai, T. Toyomasu, N. Kato, T. Sassa (2002): Erinacine Q, a new erinacine from *Hericium erinaceum*, and its biosynthetic route to erinacine C in the basidiomycete. *Biosci Biotech Bioch* 66, 2002, S. 571–575.
- Khan, I., P. L. Sangwan, J. K. Dhar, S. Koul (2012): Simultaneous quantification of five marker compounds of *Betula utilis* stem bark using a validated high-performance thin-layer chromatography method. *J Sep Sci* 35, 2012, S. 392–399.
- Kim, K., J. K. Cha (2009): Total synthesis of cyathin A<sub>3</sub> and cyathin B<sub>2</sub>. *Angew Chem Int Edit* 48, 2009, S. 5334–5336.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon, D. W. Minter, J. A. Stalpers (2008): Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. Tenth edition. ISBN: 978-0-85199-826-8. CABI Europe, Oxon.
- Kita, T., Y. Takaya, Y. Oshima, T. Ohta, K. Aizawa, T. Hirano, T. Inakuma (1998): Scabronines B, C, D, E and F, novel diterpenoids showing stimulating activity of nerve growth factor-synthesis, from the mushroom *Sarcodon scabrosus*. *Tetrahedron* 54, 1998, S. 11877–11886.

- Kolosova, A. Y., W.-B. Shim, Z.Y. Yang, S. A. Eremin, D.H. Chung (2006): Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B<sub>1</sub>. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Anal Bioanal Chem* 384, 2006, S. 286–294.
- Krzyczkowski, W., E. Malinowska, F. Herold (2010): Erinacine A biosynthesis in submerged cultivation of *Hericium erinaceum*: Quantification and improved cultivation. *Eng Life Sci* 10, 2010, S. 446–457.
- Lagace, J., S. Arsenault, E. A. Cohen (1994): Alcian blue-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J Immunol Methods* 175, 1994, S. 131–135.
- Lee, A. K., D. M. Lewis, P. J. Ashman (2012): Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass Bioenerg* 46, 2012, S. 89–101.
- Lee, E. W., K. Shizuki, S. Hosokawa, M. Suzuki, H. Suganuma, T. Inakuma, J. X. Li, M. Ohnishi-Kameyama, T. Nagata, S. Furukawa, H. Kawagishi (2000): Two novel diterpenoids, erinacines H and I from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Biosci Biotech Bioch* 64, 2000, S. 2402–2405.
- Lee, W. Y., Y. Park, J. K. Ahn, K. H. Ka, S. Y. Park (2007): Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme Microb Tech* 40, 2007, S. 249–254.
- Lichtenthaler, H. K. (1999): The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Phys* 50, 1999, S. 47–65.
- Lindequist, U., T. H. J. Niedermeyer, W. D. Jülich (2005): The pharmacological potential of mushrooms. *Evid-based Compl Alt* 2, 2005, S. 285–299.
- Lin, E., Y. Chen (2007): Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. *Bioresource Technol* 98, 2007, S. 2511–2517.
- Lin, E. S., S. C. Sung (2006): Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Int J Food Microbiol* 108, 2006, S. 182–187.
- Liu, L., X. W. Shi, S. C. Zong, J. J. Tang, J. M. Gao (2012a): Scabronine M, a novel inhibitor of NGF-induced neurite outgrowth from PC12 cells from the fungus *Sarcodon scabrosus*. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 2012, S. 2401–2406.



- Liu, W. T., Y. L. Yang, Y. Xu, A. Lamsa, N. M. Haste, J. Y. Yang, J. Ng, D. Gonzalez, C. D. Ellermeier, P. D. Straight, P. A. Pevzner, J. Pogliano, V. Nizet, K. Pogliano, P. C. Dorrestein (2010): Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*. *P Natl Acad Sci USA* 107, 2010, S. 16286–16290.
- Liu, X. F., X. Wang, R. J. Weaver, L. Calliste, C. Xia, Y. J. He, L. Chen (2012b): Validation of a gyrolab assay for quantification of rituximab in human serum. *J Pharmacol Toxicol* 65, 2012, S. 107–114.
- Liu, Y., C. Wang, W. Gui, J. Bi, M. Jin, G. Zhu (2009): Development of a sensitive competitive indirect ELISA for parathion residue in agricultural and environmental samples. *Ecotox Environ Safe* 72, 2009, S. 1673–1679.
- Li, Z. K., Y. Y. Zhu, X. G. Yin, C. F. Peng, W. Chen, L. Q. Liu, L. M. Yin, C. L. Xu (2009): Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus pesticide paraoxon-methyl. *Immunol Invest* 38, 2009, S. 510–525.
- Lomascolo, A., C. Stentelaire, M. Asther, L. Lesage-Meessen (1999): Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends Biotechnol* 17, 1999, S. 282–289.
- Lu, L., J. Li, Y. Cang (2002): PCR-based sensitive detection of medicinal fungi *Hericium* species from ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Biol Pharm Bull* 25, 2002, S. 975–980.
- Ma, B. J., J. K. Liu (2005): A new bitter diterpenoid from *Sarcodon scabrosus*. *J Basic Microb* 45, 2005, S. 328–330.
- Ma, B. J., Y. Ruan (2008): Scabronine J, a new cyathane-type diterpenoid from the basidiomycete *Sarcodon scabrosus*. *J Antibiot* 61, 2008, S. 86–88.
- Ma, B. J., J. W. Shen, H. Y. Yu, Y. Ruan, T. T. Wu, X. Zhao (2010): Hericenones and erinacines: stimulators of nerve growth factor (NGF) biosynthesis in *Hericium erinaceus*. *Mycology* 1, 2010, S. 92–98.
- Ma, B. J., H. J. Zhu, J. K. Liu (2004): Isolation and characterization of new bitter diterpenoids from the basidiomycetes *Sarcodon scabrosus*. *Helv Chim Acta* 87, 2004, S. 2877–2881.
- Ma, B. J., Y. Ruan, J. W. Shen (2008a): Method for preparing compound of erinacine P. Patent (China). Bibliographische IPC: C12R1/645. Veröffentlichungsnummer: CN101736069B.

- Ma, B. J., Y. Zhou, L. Z. Li, H. M. Li, Z. M. Gao, Y. Ruan (2008b): A new cyathane-xyloside from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Z Naturforsch C* 10, 2008, S. 1241–1242.
- Manzoni, M., S. Bergomi, M. Rollini, V. Cavazzoni (1999): Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnol Lett* 21, 1999, S. 253–257.
- Manzoni, M., M. Rollini (2002): Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biot* 58, 2002, S. 555–564.
- Mercader, J. V., C. Agulló, F. A. Esteve-Turrillas, A. Abad-Somovilla, A. Abad-Fuentes (2013): Immunoassays for pyraclostrobin analysis in processed food products using novel monoclonal antibodies and QuEChERS-based extracts. *Food Control* 32, 2013, S. 42–48.
- Miller, L. C., J. M. Ndungu, R. Sarpong (2009): Parallel kinetic resolution approach to the cyathane and cyanthiwigin diterpenes using a cyclopropanation/Cope rearrangement. *Angew Chem Int Edit* 48, 2009, S. 2398–2402.
- Mizuno, T., T. Wasa, H. Ito, C. Suzuki, N. Ukai (1992): Antitumor-active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, an edible and medicinal mushroom called yamabushitake or houtou. *Biosci Biotech Bioch* 56, 1992, S. 347–348.
- Mohammad, K., A. Esen (1989): A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blots and western blots. *J Immunol Methods* 117, 1989, S. 141–145.
- Mullen, A. K., M. R. Clench, S. Crosland, K. R. Sharples (2005): Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 19, 2005, S. 2507–2516.
- Mushens, R., M. Scott (1990): A fast and efficient method for quantification of monoclonal antibodies in an ELISA using a novel incubation system. *J Immunol Methods* 131, 1990, S. 83–89.
- Nagano, M., K. Shimizu, R. Kondo, C. Hayashi, D. Sato, K. Kitagawa, K. Ohnuki (2010): Reduction of depression and anxiety by 4 weeks *Hericium erinaceus* intake. *Biomed Res – Tokyo* 31, 2010, S. 231–237.
- Nguyen, T. H., G. H. Fleet, P. L. Rogers (1998): Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl Microbiol Biot* 50, 1998, S. 206–212.
- Nitschke, J., H. J. Altenbach, T. Malolepszy, H. Molleken (2011): A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydr Res* 346, 2011, S. 1307–1310.

- Nuhn, P. (2006): *Naturstoffchemie. Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*; mit 80 Tabellen. ISBN: 3-7776-1363-0. Hirzel, Stuttgart.
- Ohta, T., T. Kita, N. Kobayashi, Y. Obara, N. Nakahata, Y. Ohizumi, Y. Takaya, Y. Oshima (1998): Scabronine A, a novel diterpenoid having potent inductive activity of the nerve growth factor synthesis, isolated from the mushroom, *Sarcodon scabrosus*. *Tetrahedron Lett* 39, 1998, S. 6229–6232.
- Okamoto, K., T. Sakai, A. Shimada, R. Shirai, H. Sakamoto, S. Yoshida, F. Ojima, Y. Ishiguro, H. Kawagishi (1993): Antimicrobial chlorinated orcinol derivatives from mycelia of *Hericium erinaceum*. *Phytochemistry* 34, 1993, S. 1445–1446.
- Orihara, N., T. Kuzuyama, S. Takahashi, K. Furihata, H. Seto (1998): Studies on the biosynthesis of terpenoid compounds produced by actinomycetes. 3. Biosynthesis of the isoprenoid side chain of novobiocin via the non-mevalonate pathway in *Streptomyces niveus*. *J Antibiot* 51, 1998, S. 676–678.
- Park, H. G., H. G. Ko, S. H. Kim, W. M. Park (2004): Molecular identification of asian isolates of medicinal mushroom *Hericium erinaceum* by phylogenetic analysis of the nuclear ITS rDNA. *J Microbiol Biotechn* 14, 2004, S. 816–821.
- Paterson, R. R. M. (2006): *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67, 2006, S. 1985–2001.
- Perez, J., J. Munoz-Dorado, T. de La Rubia, J. Martinez (2002): Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol* 5, 2002, S. 53–63.
- Petrova, R. D., J. Mahajna, A. Z. Reznick, S. P. Wasser, C. M. Denchev, E. Nevo (2007): Fungal substances as modulators of NF- $\kappa$ B activation pathway. *Mol Biol Rep* 34, 2007, S. 145–154.
- Peukert, M., A. Matros, G. Lattanzio, S. Kaspar, J. Abadía, H.P. Mock (2012): Spatially resolved analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging (MALDI-MSI). *New Phytol* 193, 2012, S. 806–815.
- Piers, E., M. Gilbert, K. L. Cook (2000): Total synthesis of the cyathane diterpenoid (+/-)-sarcodonin G. *Org Lett* 2, 2000, S. 1407–1410.
- Priya Rani, M., K. Padmakumari (2012): HPTLC and reverse phase HPLC methods for the simultaneous quantification and in vitro screening of antioxidant potential of isolated sesquiterpenoids from the rhizomes of *Cyperus rotundus*. *J Chromatogr B* 904, 2012, S. 22–28.
- Rabe, U. (1989): Fermentation von *Cyathus striatus* (Huds. ex Pers.) Willd (Basidiomycetes) und Biosynthese der Striatine. Diss., Universität Kaiserslautern, Deutschland.

- Ramírez, D. A., S. V. Muñoz, L. Atehortua, F. C. Michel (2010): Effects of different wavelengths of light on lignin peroxidase production by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* grown in submerged cultures. *Bioresource Technol* 101, 2010, S. 9213–9220.
- Ricci-Silva, M. E., M. Vitolo, J. Abrahão-Neto (2000): Protein and glucose 6-phosphate dehydrogenase releasing from baker's yeast cells disrupted by a vertical bead mill. *Process Biochem* 35, 2000, S. 831–835.
- Robinson, S., K. Warburton, M. Seymour, M. Clench, J. Thomas-Oates (2007): Localization of water-soluble carbohydrates in wheat stems using imaging matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *New Phytol* 173, 2007, S. 438–444.
- Rohmer, M. (1999): The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants†. *Nat Prod Rep* 16, 1999, S. 565–574.
- Roupas, P., J. Keogh, M. Noakes, C. Margetts, P. Taylor (2012): The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *J Funct Foods* 4, 2012, S. 687–709.
- Sachetelli, S., C. Beaulac, J. Lagace (1998): Aminoglycoside detection using a universal ELISA binding procedure onto polystyrene microtiter plates in comparison with HPLC analysis and microbiological agar-diffusion assay. *Biochim Biophys Acta* 1379, 1998, S. 35–41.
- Sai, N., Y. Chen, N. Liu, G. Yu, P. Su, Y. Feng, Z. Zhou, X. Liu, H. Zhou, Z. Gao (2010): A sensitive immunoassay based on direct hapten coated format and biotin–streptavidin system for the detection of chloramphenicol. *Talanta* 82, 2010, S. 1113–1121.
- Saito, T., F. Aoki, H. Hirai, T. Inagaki, Y. Matsunaga, T. Sakakibara, S. Sakemi, Y. Suzuki, S. Watanabe, O. Suga, T. Sujaku, A. A. Smogowicz, S. J. Truesdell, J. W. Wong, A. Nagahisa, Y. Kojima, N. Kojima (1998): Erinacine E as a kappa opioid receptor agonist and its new analogs from a basidiomycete, *Hericium ramosum*. *J Antibiot* 51, 1998, S. 983–990.
- Samsonova, J. V., M. Rubtsova, A. V. Kiseleva, A. A. Ezhov, A. M. Egorov (1999): Chemiluminescent multiassay of pesticides with horseradish peroxidase as a label. *Biosens Bioelectron* 14, 1999, S. 273–281.
- Sathe, M., S. Merwyn, R. Ghorpade, G. S. Agarwal, M. K. Rao, G. P. Rai, M. P. Kaushik (2011): Design and synthesis of immunoconjugates and development of competition inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (CIEIA) for the detection of o-isopropyl methylphosphonofluoridate (sarin): An organophosphorous toxicant. *J Hazard Mater* 192, 2011, S. 1720–1728.

- Schaefer, B. (2007): *Naturstoffe der chemischen Industrie*. ISBN: 3-8274-1614-0. Elsevier, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg.
- Schober, Y., S. Guenther, B. Spengler, A. Römpf (2012): High-resolution matrix-assisted laser desorption/ionization imaging of tryptic peptides from tissue. *Rapid Commun Mass Sp* 26, 2012, S. 1141–1146.
- Schoenian, I., M. Spiteller, M. Ghaste, R. Wirth, H. Herz, D. Spiteller (2011): Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. *P Natl Acad Sci USA* 108, 2011, S. 1955–1960.
- Schöffler, A., T. Anke (2009): Secondary metabolites of basidiomycetes. In: T. Anke und D. Weber (Hrsg.). *The Mycota (XV). Physiology and Genetics. Selected Basic and Applied Aspects*. ISBN: 978-3-642-00285-4. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. S. 209-227.
- Seeley, E. H., K. Schwamborn, R. M. Caprioli (2011): Imaging of intact tissue sections: moving beyond the microscope. *The J Biol Chem* 286, 2011, S. 25459–25466.
- Shanta, S. R., T. Y. Kim, J. H. Hong, J. H. Lee, C. Y. Shin, K.-H. Kim, Y. H. Kim, S. K. Kim, K. P. Kim (2012): A new combination MALDI matrix for small molecule analysis: application to imaging mass spectrometry for drugs and metabolites. *Analyst* 137, 2012, S. 5757–5762.
- Shibata, H., T. Tokunaga, D. Karasawa, A. Hirota, M. Nakayama, H. Nozaki, T. Tada (1989): Isolation and characterization of new bitter diterpenoids from the fungus *Sarcodon scabrosus*. *Agr Biol Chem Tokyo* 53, 1989, S. 3373–3375.
- Shi, X. W., L. Liu, J. M. Gao, A. L. Zhang (2011): Cyathane diterpenes from chinese mushroom *Sarcodon scabrosus* and their neurite outgrowth-promoting activity. *Eur J Med Chem* 46, 2011, S. 3112–3117.
- Shynkaryk, M. V., N. I. Lebovka, J.L. Lanoisellé, M. Nonus, C. Bedel-Clotour, E. Vorobiev (2009): Electrically-assisted extraction of bio-products using high pressure disruption of yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). *J Food Eng* 92, 2009, S. 189–195.
- Smith, G., R. P. Holman (2004): The prozone phenomenon with syphilis and HIV-1 co-infection. *South Med J* 97, 2004, S. 379–382.
- Snider, B. B., N. H. Vo, S. V. O'Neil (1998): Synthesis of (±)-allocyathin B<sub>2</sub> and (+)-erinacine A. *J Org Chem* 63, 1998, S. 4732–4740.
- Sprecher, E., H. P. Hanssen (1982): Influence of strain specificity and culture conditions on terpene production by fungi. *Planta Med* 44, 1982, S. 41–43.

- Steinbüchel, A. (2003): Production of rubber-like polymers by microorganisms. *Curr Opin Microbiol* 6, 2003, S. 261–270.
- Tanaka, H., Y. Shoyama (1998): Development of ELISA-analysis methods for the quantification of bioactive natural products in plants, phytomedicines and in humans or similar. *Phytomedicine* 5, 1998, S. 397–415.
- Taskova, R. M., H. Zorn, U. Krings, H. Bouws, R. G. Berger (2006): A comparison of cell wall disruption techniques for the isolation of intracellular metabolites from *Pleurotus* and *Lepista* sp. *Z Naturforsch* 61, 2006, S. 347–350.
- Taubert, J., U. Krings, R. G. Berger (2000): A comparative study on the disintegration of filamentous fungi. *J Microbiol Meth* 42, 2000, S. 225–232.
- Taupp, D. E., M. Nimtz, R. G. Berger, H. Zorn (2008): Stress response of *Nidula niveo-tomentosa* to UV-A light. *Mycologia* 100, 2008, S. 529–538.
- Tkac, J., I. Vostiar, C.F. Mandenius (2004): Evaluation of disruption methods for the release of intracellular recombinant protein from *Escherichia coli* for analytical purposes. *Biotechnol Appl Bioc* 40, 2004, S. 83–88.
- Tori, M., N. Toyoda, M. Sono (1998): Total synthesis of allocyathin B<sub>2</sub>, a metabolite of bird's nest fungi. *J Org Chem* 63, 1998, S. 306–313.
- Tothiam, C., W. Phrompittayarat, W. Putalun, H. Tanaka, S. Sakamoto, I. A. Khan, K. Ingkaninan (2011): An enzyme-linked immunosorbant assay using monoclonal antibody against bacoside A<sub>3</sub> for determination of jujubogenin glycosides in *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *Phytochem Analysis* 22, 2011, S. 385–391.
- Turło, J., B. Gutkowska, F. Herold, W. Krzyczkowski, A. Błażewicz, R. Kocjan (2008): Optimizing vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis by mycelial cultures of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. *Enzyme Microb Tech* 43, 2008, S. 369–374.
- Ueda, K., S. Kodani, M. Kubo, K. Masuno, A. Sekia, K. Nagai, H. Kawagishi (2009): Endoplasmic reticulum (ER) stress-suppressive compounds from scrap cultivation beds of the mushroom *Hericium erinaceum*. *Biosci Biotech Bioch* 73, 2009, S. 1908–1910.
- Wang, H. Q., J. T. Yu, J. J. Zhong (1999): Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by sucrose feeding strategy. *Process Biochem* 35, 1999, S. 479–483.
- Watanabe, H., M. Nakada (2008a): Biomimetic Total synthesis of (–)-erinacine E. *J Am Chem Soc* 130, 2008, S. 1150–1151.
- Watanabe, H., M. Nakada (2008b): Synthetic studies on (–)-scabronine A. *Tetrahedron Lett* 49, 2008, S. 1518–1522.

- Watanabe, H., M. Takano, A. Umino, T. Ito, H. Ishikawa, M. Nakada (2007): Enantioselective total synthesis of (-)-erinacine B. *Org Lett* 9, 2007, S. 359–362.
- Wender, P. A., F. C. Bi, M. A. Brodney, F. Gosselin (2001): Asymmetric synthesis of the tricyclic core of NGF-inducing cyathane diterpenes via a transition-metal-catalyzed [5 + 2] cycloaddition. *Org Lett* 3, 2001, S. 2105–2108.
- White, T., T. Bruns, S. Lee, J. Taylor (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., D. Gelfand, J. Shinsky, T. White (Hrsg.): *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. ISBN: 0-12-372180-6. Academic Press, S. 315–322.
- Whittington, R. J. (1992): Evaluation of a simple method for improving the precision of an ELISA detecting antibody in serum. *J Immunol Methods* 148, 1992, S. 57–64.
- Wortberg, M., M. H. Goodrow, S. J. Gee, B. D. Hammock (1996a): Immunoassay for simazine and atrazine with low cross-reactivity for propazine. *J Agr Food Chem* 44, 1996, S. 2210–2219.
- Wortberg, M., G. Jones, S. Kreissig, D. Rocke, S. Gee, B. Hammock (1996b): An approach to the construction of an immunoarray for differentiating and quantitating cross reacting analytes. *Anal Chim Acta* 319, 1996, S. 291–303.
- Wright, D. L., C. R. Whitehead (2000): Recent progress on the synthesis of cyathane type diterpenes. A review. *Org Prep Proced Int* 32, 2000, S. 307–330.
- Wu, J., Z.Y. Ding, K.C. Zhang (2006): Improvement of exopolysaccharide production by macro-fungus *Auricularia auricula* in submerged culture. *Enzyme Microb Tech* 39, 2006, S. 743–749.
- Xu, D. M., X. Y. Yu, Y. Q. Liu, J. T. Feng, L. G. Pan, X. J. Liu, J. He, X. Zhang (2005): Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for podophylotoxin. *Int Immunopharmacol* 5, 2005, S. 1583–1592.
- Yang, L., L.M. Zhang (2009): Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydr Polym* 76, 2009, S. 349–361.
- Yim, M. H., J. W. Shin, J. Y. Son, S. M. Ho, S. H. Han, J. H. Cho, C. K. Cho, H. S. Yoo, Y. W. Lee, C. G. Son (2007): Soluble components of *Hericium erinaceum* induce NK cell activation via production of interleukin-12 in mice splenocytes. *Acta Pharm Sinic* 28, 2007, S. 901–907.
- Zeng, K., T. Yang, P. Zhong, S. Zhou, L. Qu, J. He, Z. Jiang (2007): Development of an indirect competitive immunoassay for parathion in vegetables. *Food Chem* 102, 2007, S. 1076–1082.

- Zhang, M., S. Cui, P. Cheung, Q. Wang (2007): Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci Tech* 18, 2007, S. 4–19.
- Zhang, M., S. Liu, H. Zhuang, Y. Hu (2012): Determination of dimethyl phthalate in environment water samples by a highly sensitive indirect competitive ELISA. *Appl Biochem Biotech* 166, 2012, S. 436–445.
- Zheng, H., J. Yin, Z. Gao, H. Huang, X. Ji, C. Dou (2011): Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: A comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. *Appl Biochem Biotech* 164, 2011, S. 1215–1224.
- Zheng, W., M. Zhang, Y. Zhao, K. Miao, H. Jiang (2009): NMR-based metabonomic analysis on effect of light on production of antioxidant phenolic compounds in submerged cultures of *Inonotus obliquus*. *Bioresource Technol* 100, 2009, S. 4481–4487.
- Zorn, H., S. Langhoff, M. Scheibner, R. G. Berger (2003): Cleavage of  $\beta$ ,  $\beta$ -carotene to flavor compounds by fungi. *Appl Microbiol Biot* 62, 2003, S. 331–336.



## 7 Anhang

### 7.1 NMR-Analyse

#### Striatat A:

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 0.969 ( $\text{CH}_3$ , d, 19,20-H), 0.982 ( $\text{CH}_3$ , d, 19,20-H), 0.997 ( $\text{CH}_3$ , s, 16-H), 1.006 ( $\text{CH}_3$ , s, 17-H), 1.529 ( $\text{CH}_2$ , 8-H), 1.551 – 1.626 ( $\text{CH}_2$ , 1-H), 1.604 ( $\text{CH}_2$ , 7-H), 2.158 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ , s), 2.274 ( $\text{CH}_2$ , 2-H), 2.382 ( $\text{CH}$ , 5-H), 2.714 – 2.836 ( $\text{CH}_2$ , 10-H), 2.736 ( $\text{CH}$ , sept, 18-H), 3.395 ( $\text{CH}$ , 13-H), 3.978 – 4.339 ( $\text{CH}_2$ , 5'-H), 4.142 ( $\text{CH}$ , 14-H), 4.852 ( $\text{CH}$ , 4'-H), 5.330 ( $\text{CH}$ , 1'-H), 6.968 ( $\text{CH}$ , 11-H), 9.249 ( $\text{CH}$ , 15-H)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 17.5 ( $\text{CH}_3$ , C-16), 20.5 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 21.5 ( $\text{CH}_3$ , C-19 oder C-20), 21.9 ( $\text{CH}_3$ , C-19 oder C-20), 24.6 ( $\text{CH}_3$ , C-17), 26.9 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 27.2 ( $\text{CH}$ , C-18), 28.5 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 29.3 ( $\text{CH}_2$ , C-10), 36.4 ( $\text{CH}_2$ , C-8), 38.3 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 41.9 (C-q, C-6), 42.8 ( $\text{CH}$ , C-5), 46.5 ( $\text{CH}$ , C-13), 49.6 (C-q, C-9), 65.2 ( $\text{CH}_2$ , C-5'), 75.2 ( $\text{CH}$ , C-4'), 84.0 (C-q, C-2'), 87.4 ( $\text{CH}$ , C-14), 108.3 ( $\text{CH}$ , C-1'), 136.1 ( $\text{CH}$ , C-4), 139.9 (C-q, C-3), 142.4 (C-q, C-12), 158.0 ( $\text{CH}$ , C-11), 170.5 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 196.0 ( $\text{CH}$ , C-15), 201.0 (C-q, C-3')

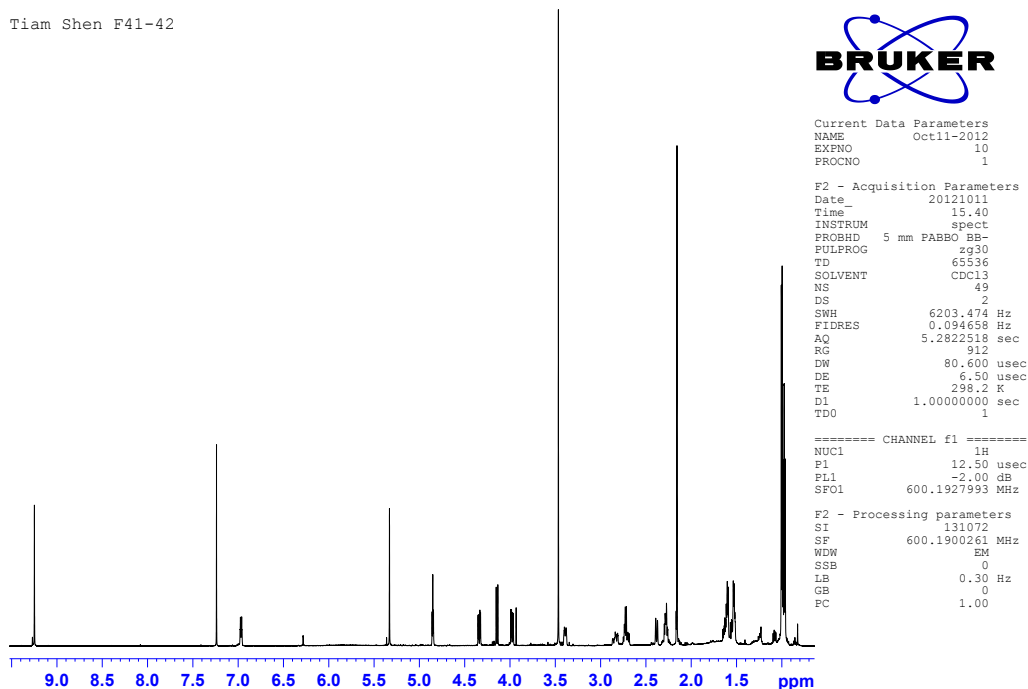


Abbildung 7.1: Striatat A,  $^1\text{H}$ .

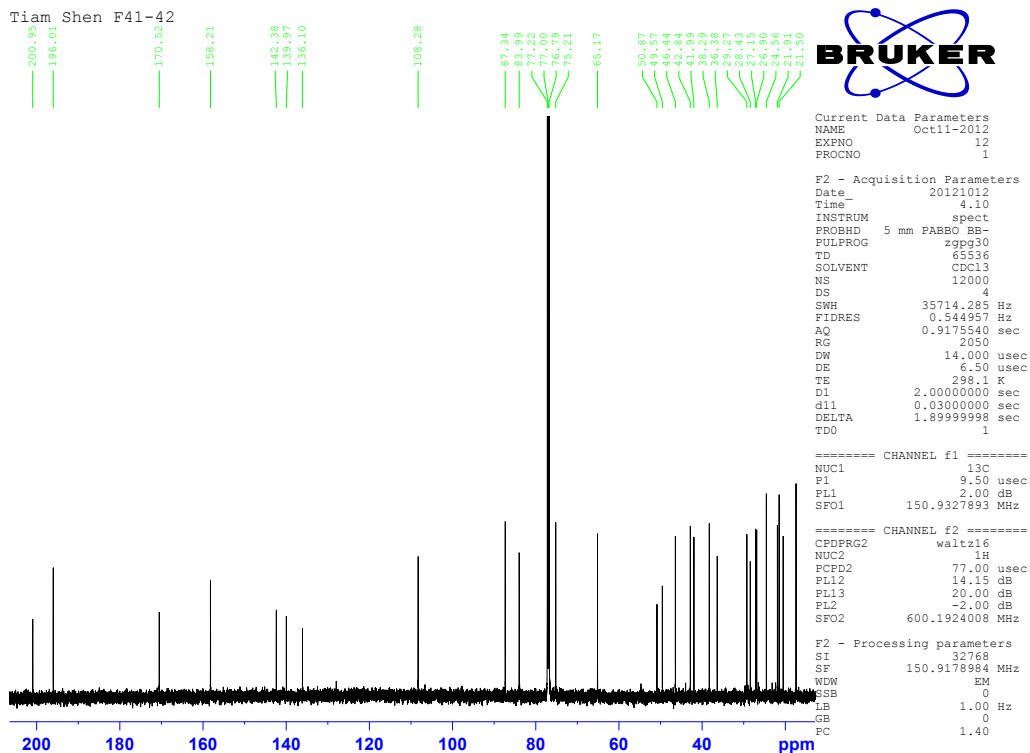
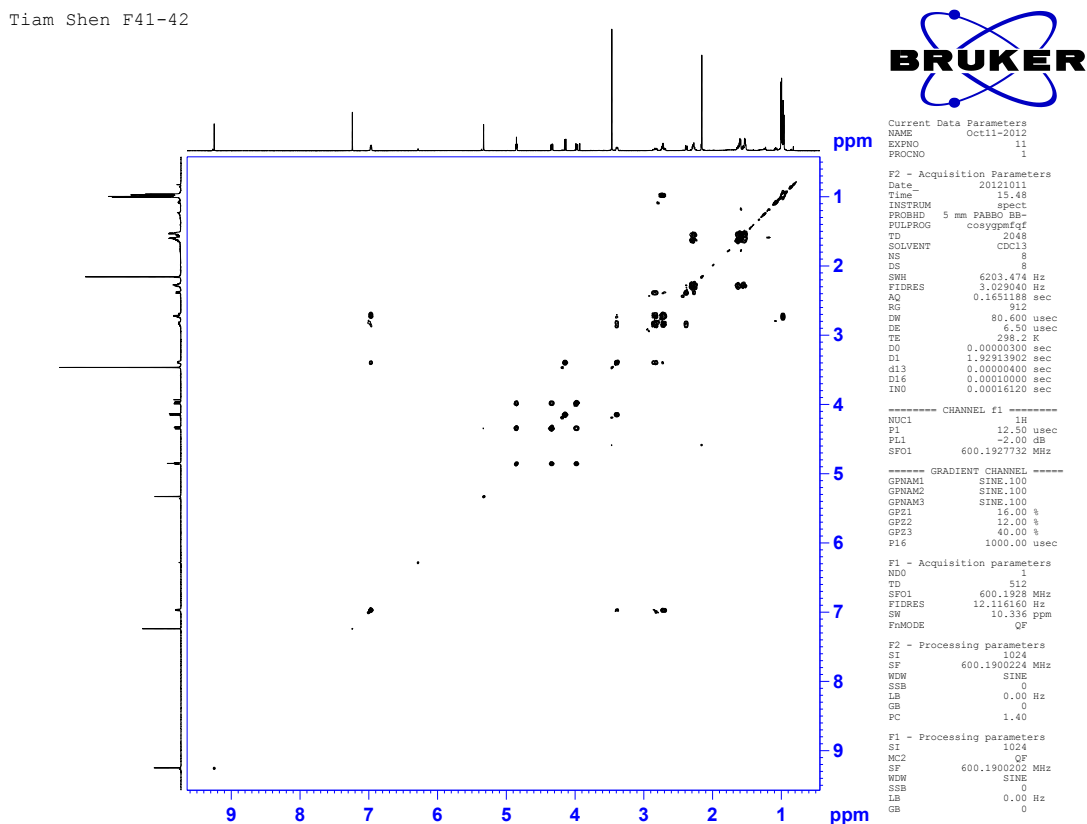
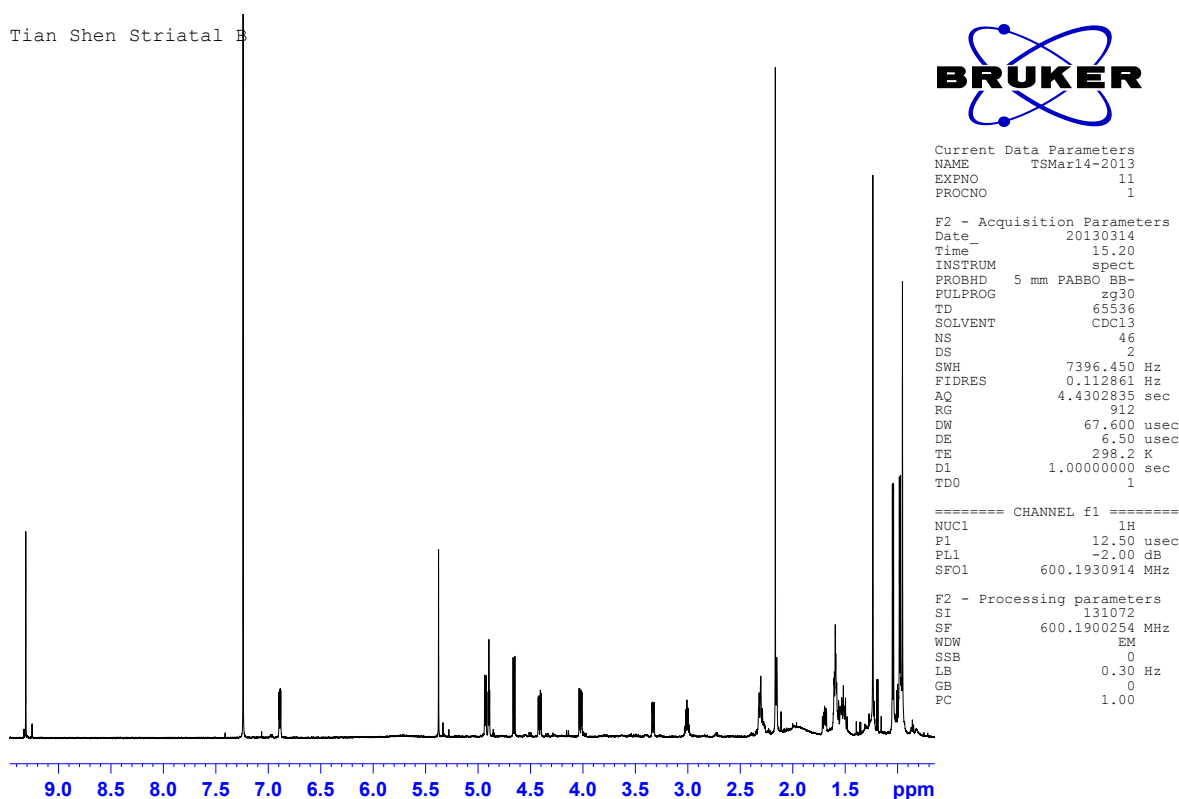
Abbildung 7.2: Striatol A,  $^{13}\text{C}$ .

Abbildung 7.3: Striatol A, COSY.

**Striatat B:**

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): d (ppm): 0.955 (s,  $\text{CH}_3$ , 17-H), 0.979 (d,  $\text{CH}_3$ , 19,20-H), 1.045 (d,  $\text{CH}_3$ , 19,20-H), 1.24 (s,  $\text{CH}_3$ , 16-H), 1.512 – 1.687 ( $\text{CH}_2$ , 1-H), 1.569 ( $\text{CH}_2$ , m, 8-H), 1.591 ( $\text{CH}_2$ , m, 7-H), 2.15 (CH, m, 5-H), 2.17 (s,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 2.30 ( $\text{CH}_2$ , m, 2-H), 3.011 (CH, sept, 18-H), 3.33 (dd, 10.5 Hz, 2.8 Hz, CH, 13-H), 4.02 – 4.41 ( $\text{CH}_2$ , 5<sub>a,b</sub>'-H), 4.66 (d, 10.4 Hz, CH, 14-H), 4.89 (t, 4.5 Hz, CH, 4'-H), 4.93 (d, 7.5 Hz, CH, 10-H), 5.38 (s, CH, 1'-H), 6.89 (dd, 7.5 Hz, 2.8 Hz, CH, 11-H), 9.31 (s, CHO, 15-H)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): d (ppm): 20.6 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 21.2 ( $\text{CH}_3$ , C-16), 21.6 ( $\text{CH}_3$ , C-19 oder C-20), 21.9 ( $\text{CH}_3$ , C-19 oder C-20), 23.9 ( $\text{CH}_3$ , C-17), 26.4 (CH, C-18), 28.8 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 28.9 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 36.7 ( $\text{CH}_2$ , C-8), 39.3 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 42.5 (C-q, C-6), 45.9 (CH, C-5), 47.1 (CH, C-13), 49.2 (C-q, C-9), 65.3 ( $\text{CH}_2$ , C-5'), 68.8 (CH, C-10), 75.3 (CH, C-4'), 84.0 (C-q, C-2'), 86.8 (CH, C-14), 108.3 (CH, C-1'), 135.1 (CH, C-4), 140.1 (C-q, C-3), 143.6 (C-q, C-12), 153.6 (CH, C-11), 170.7 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 196.5 (CHO, C-15), 201.1 (C-q, C-3')

Abbildung 7.4: Striatat B,  $^1\text{H}$ .

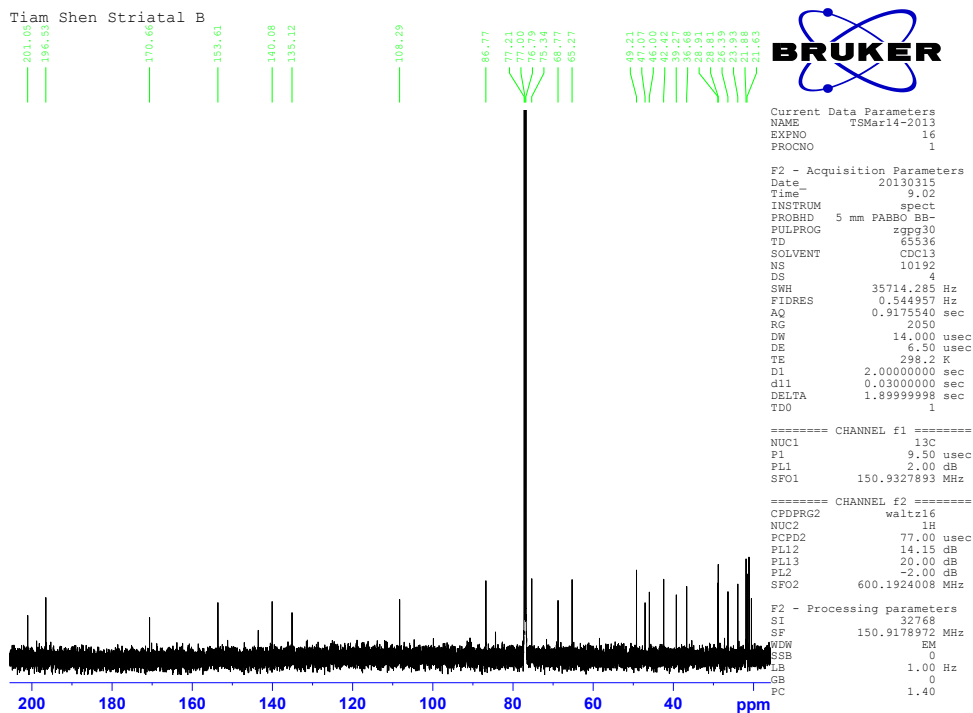
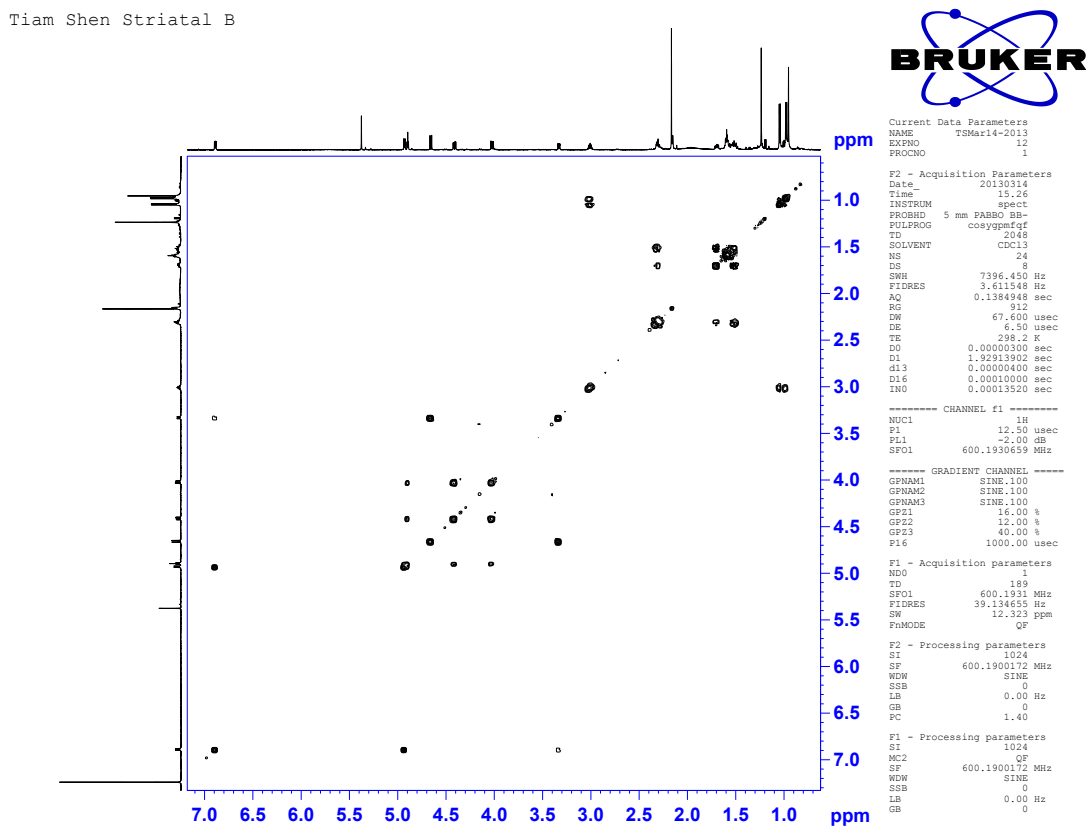
Abbildung 7.5: Striatal B,  $^{13}\text{C}$ .

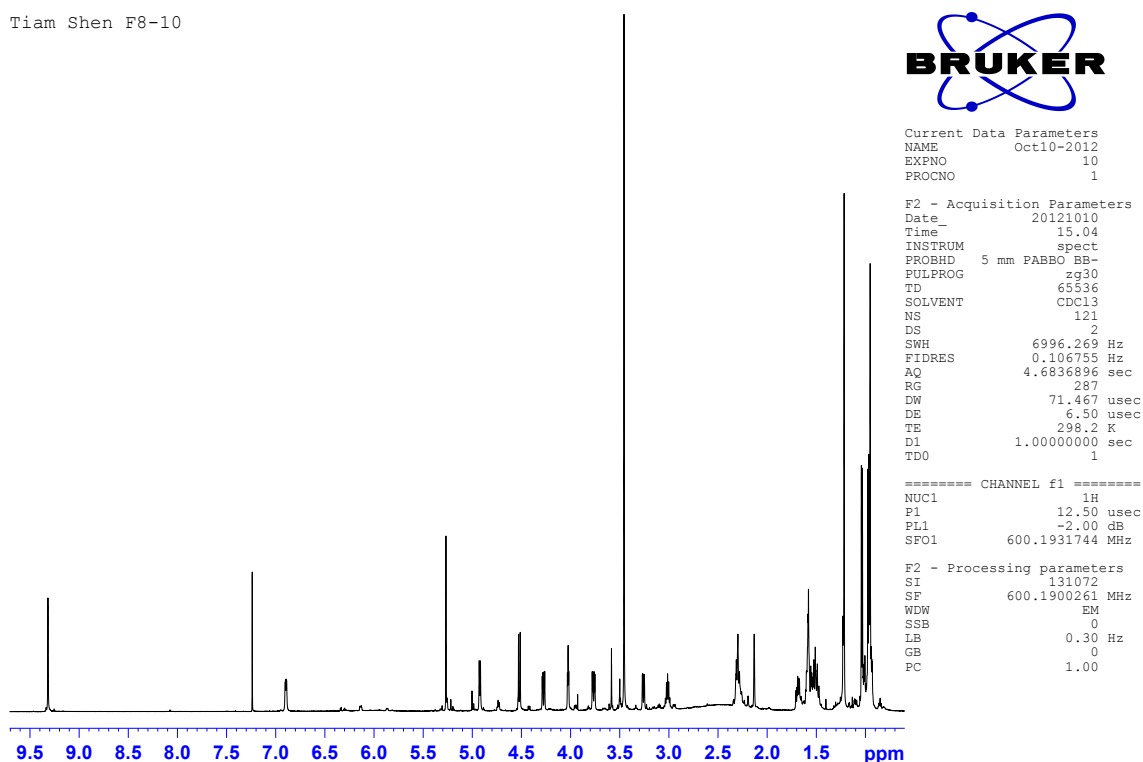
Abbildung 7.6: Striatal B, COSY.

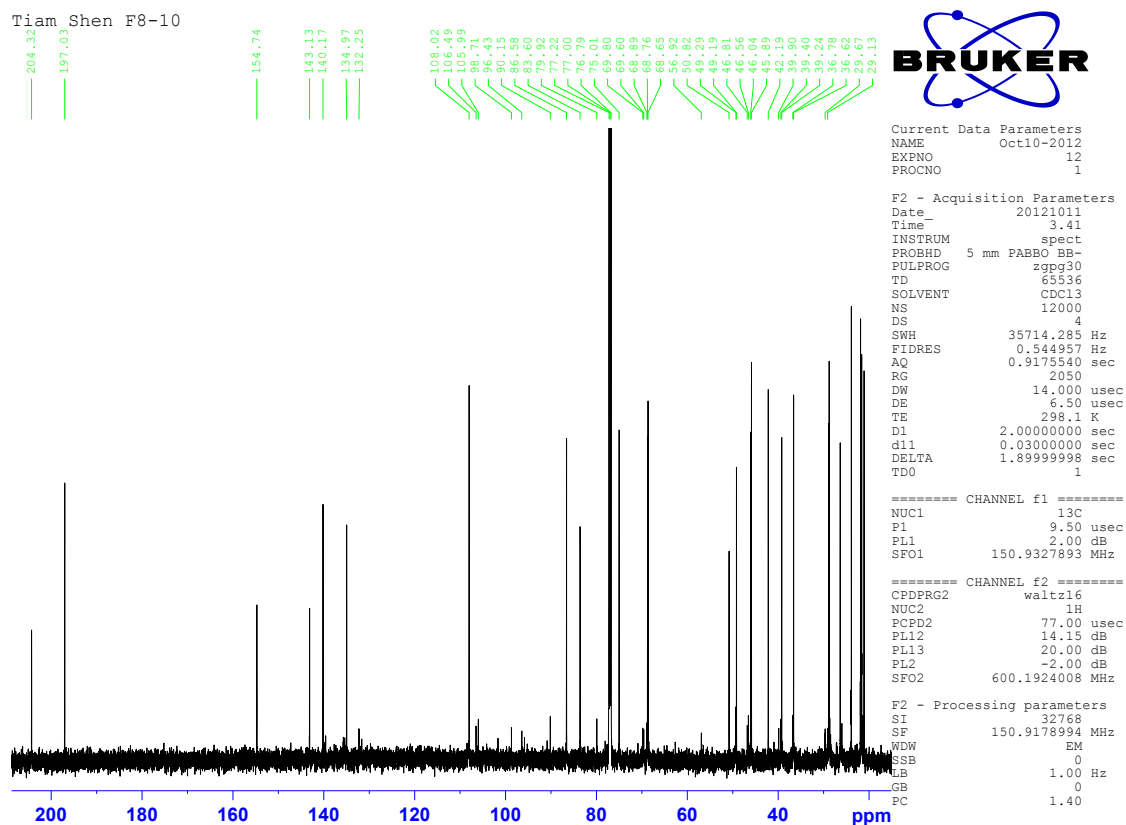
**Striatat C:**

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): (ppm): 0.954 ( $\text{CH}_3$ , s, 17-H), 0.971 ( $\text{CH}_3$ , d, 19,20-H), 1.037 ( $\text{CH}_3$ , d, 19,20-H), 1.219 ( $\text{CH}_3$ , s, 16-H), 1.506 – 1.699 ( $\text{CH}_2$ , 1-H), 1.569 ( $\text{CH}_2$ , 8-H), 1.593 ( $\text{CH}_2$ , 7-H), 2.136 ( $\text{CH}$ , 5-H), 2.311 ( $\text{CH}_2$ , 2-H), 3.019 ( $\text{CH}$ , sept, 18-H), 3.262 ( $\text{CH}$ , 13-H) 3.767 – 4.277 ( $\text{CH}_2$ , 5'-H), 4.026 ( $\text{CH}$ , 4'-H), 4.522 ( $\text{CH}$ , 14-H), 4.928 ( $\text{CH}$ , 10-H), 5.269 ( $\text{CH}$ , 1'-H), 6.897 ( $\text{CH}$ , 11-H), 9.318 ( $\text{CH}$ , 15-H)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): (ppm): 21.1 ( $\text{CH}_3$ , C-16), 21.6 ( $\text{CH}_3$ , C-19 oder C-20), 21.9 ( $\text{CH}_3$ , C-19 oder C-20), 23.9 ( $\text{CH}_3$ , C-17), 26.4 ( $\text{CH}$ , C-18), 28.2 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 28.9 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 36.6 ( $\text{CH}_2$ , C-8), 39.2 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 42.2 (C-q, C-6), 45.9 ( $\text{CH}$ , C-5), 46.0 ( $\text{CH}$ , C-13), 49.2 (C-q, C-9), 68.6 ( $\text{CH}_2$ , C-5'), 68.7 ( $\text{CH}$ , C-10), 75.0 ( $\text{CH}$ , C-4'), 83.6 (C-q, C-2'), 86.6 ( $\text{CH}$ , C-14), 108.1 ( $\text{CH}$ , C-1'), 135.0 ( $\text{CH}$ , C-4), 140.2 (C-q, C-3), 143.1 (C-q, C-12), 154.7 ( $\text{CH}$ , C-11), 197.0 ( $\text{CH}$ , C-1), 204.3 (C-q, C-3')

Tiam Shen F8-10

Abbildung 7.7: Striatat C,  $^1\text{H}$ .

Abbildung 7.8: Striatal C,  $^{13}\text{C}$ .

Tiam Shen F8-10

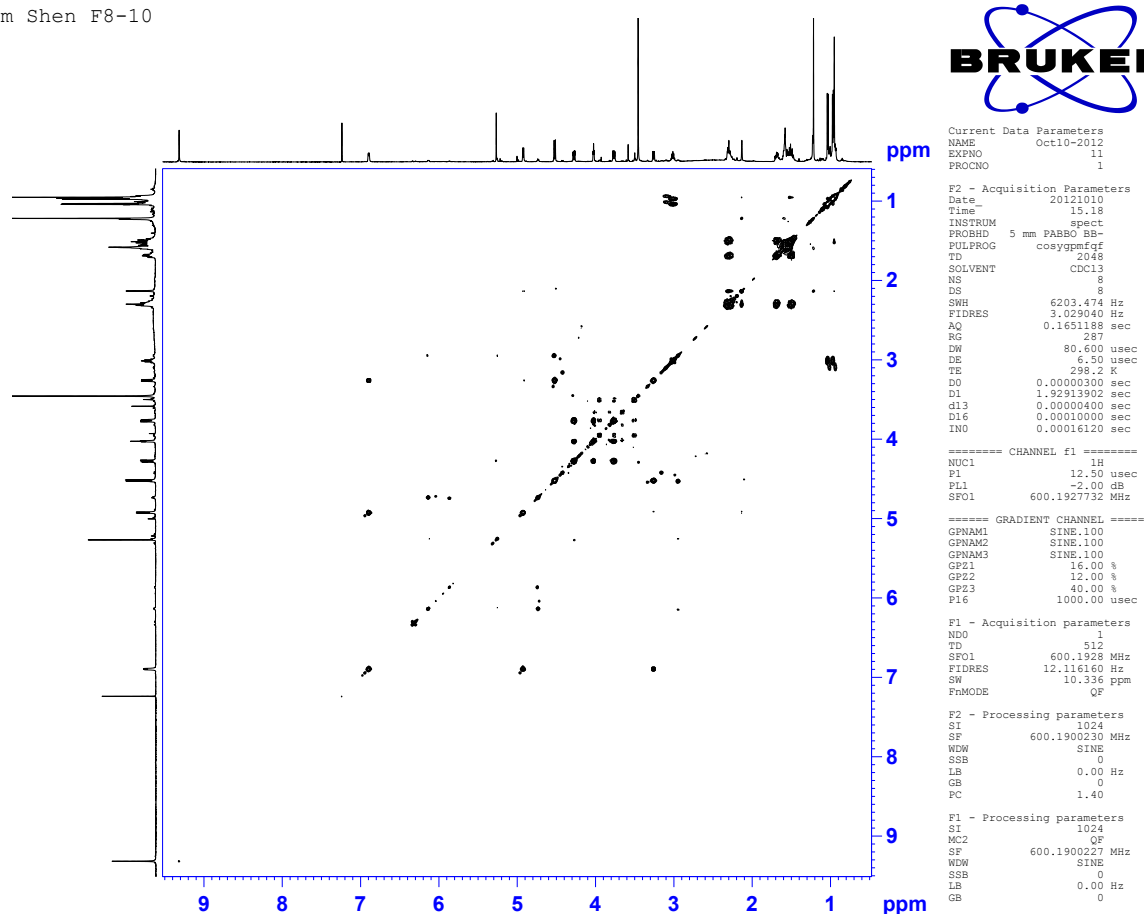
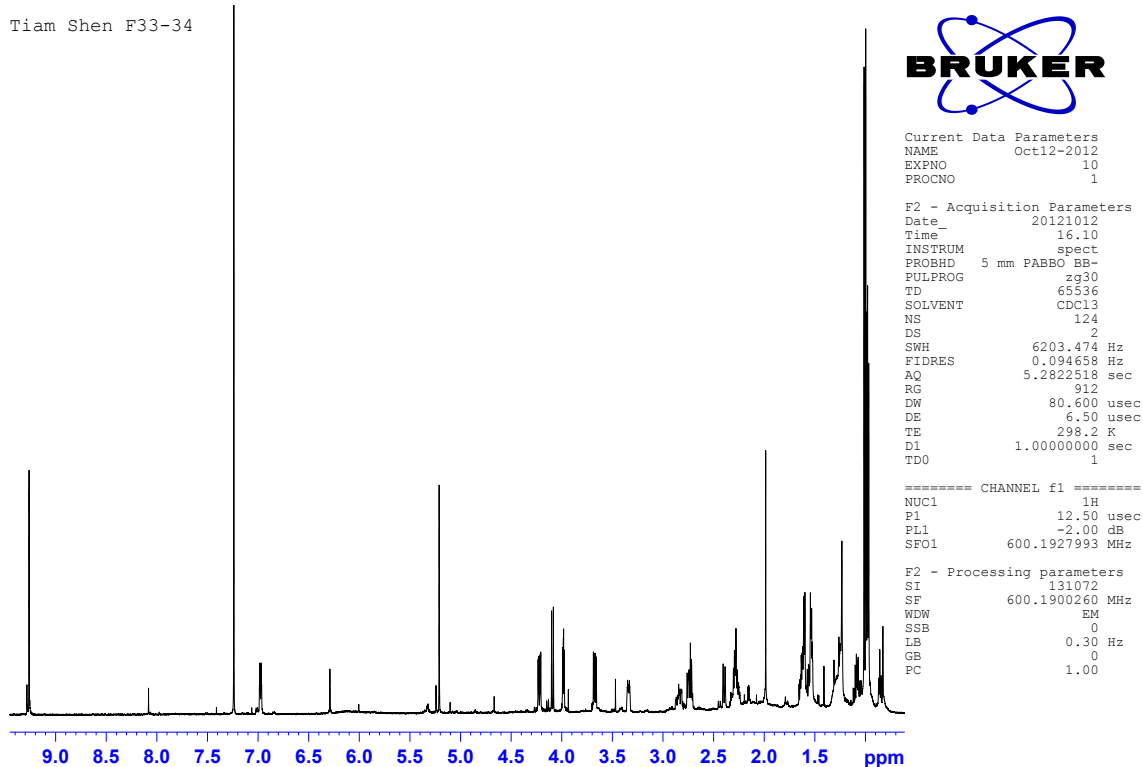
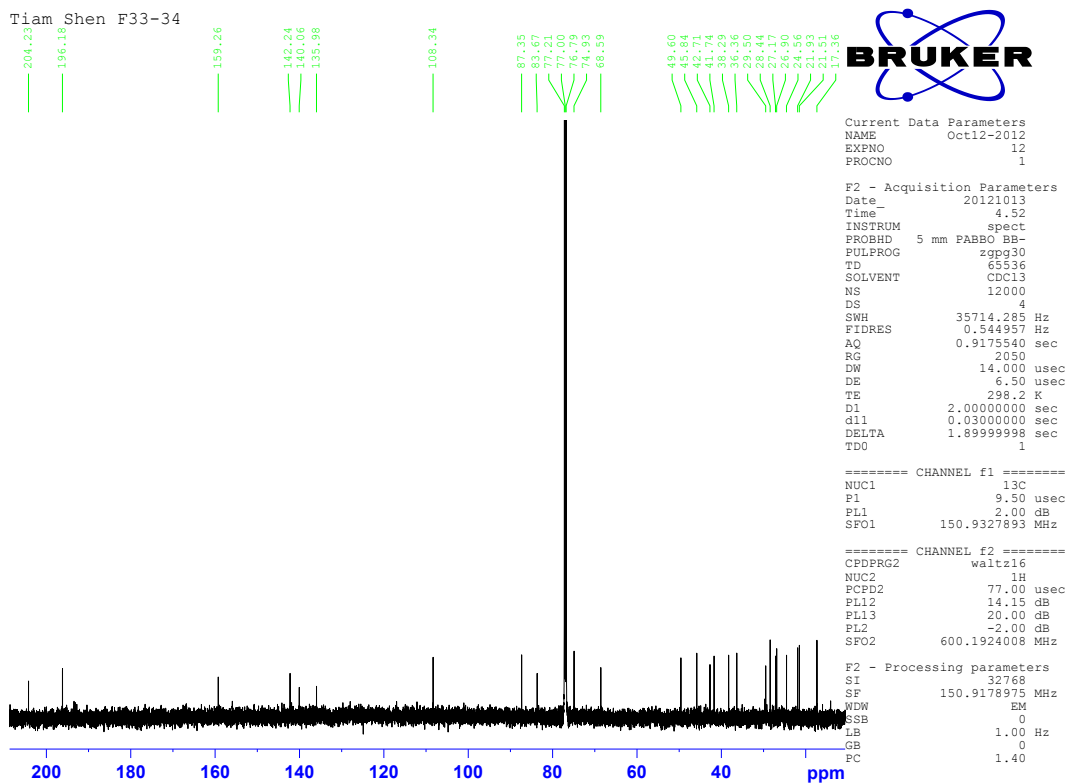


Abbildung 7.9: Striatum C, COSY.

**Striatum D:**

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 0.9734 ( $\text{CH}_3$ , d, 19,20-H), 0.988 ( $\text{CH}_3$ , d, 19,20-H), 0.999 ( $\text{CH}_3$ , s, 16-H), 1.014 ( $\text{CH}_3$ , s, 17-H), 1.529 ( $\text{CH}_2$ , 8-H), 1.551 – 1,626 ( $\text{CH}_2$ , 1-H), 1.604 ( $\text{CH}_2$ , 7-H), 2.274 ( $\text{CH}_2$ , 2-H), 2.400 ( $\text{CH}$ , 5-H), 2.752- 2.839 ( $\text{CH}_2$ , 10-H), 2.728 ( $\text{CH}$ , sept, 18-H), 3.340 ( $\text{CH}$ , 13-H) 3.675 – 4.222 ( $\text{CH}_2$ , 5'-H), 3.984 ( $\text{CH}$ , 4'-H), 4.092 ( $\text{CH}$ , 14-H), 5.213 ( $\text{CH}$ , 1'-H), 6.976 ( $\text{CH}$ , 11-H), 9.249 ( $\text{CH}$ , 15-H)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 17.5 ( $\text{CH}_3$ , C-16), 21.5 ( $\text{CH}_3$ , C-19 oder C-20), 21.9 ( $\text{CH}_3$ , C-19 oder C-20), 24.6 ( $\text{CH}_3$ , C-17), 26.9 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 27.2 ( $\text{CH}$ , C-18), 28.5 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 29.5 ( $\text{CH}_2$ , C-10), 36.4 ( $\text{CH}_2$ , C-8), 38.4 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 41.8 (C-q, C-6), 42.9 ( $\text{CH}$ , C-5), 45.9 ( $\text{CH}$ , C-13), 49.6 (C-q, C-9), 68.5 ( $\text{CH}_2$ , C-5'), 75.0 ( $\text{CH}$ , C-4'), 84.0 (C-q, C-2'), 87.4 ( $\text{CH}$ , C-14), 108.3 ( $\text{CH}$ , C-1'), 136.1 ( $\text{CH}$ , C-4), 139.9 (C-q, C-3), 142.4 (C-q, C-12), 159.3 ( $\text{CH}$ , C-11), 196.0 ( $\text{CH}$ , C-15), 201.0 (C-q, C-3')

Abbildung 7.10: Striatol D,  $^1\text{H}$ .Abbildung 7.11: Striatol D,  $^{13}\text{C}$ .



Tiam Shen F33-34

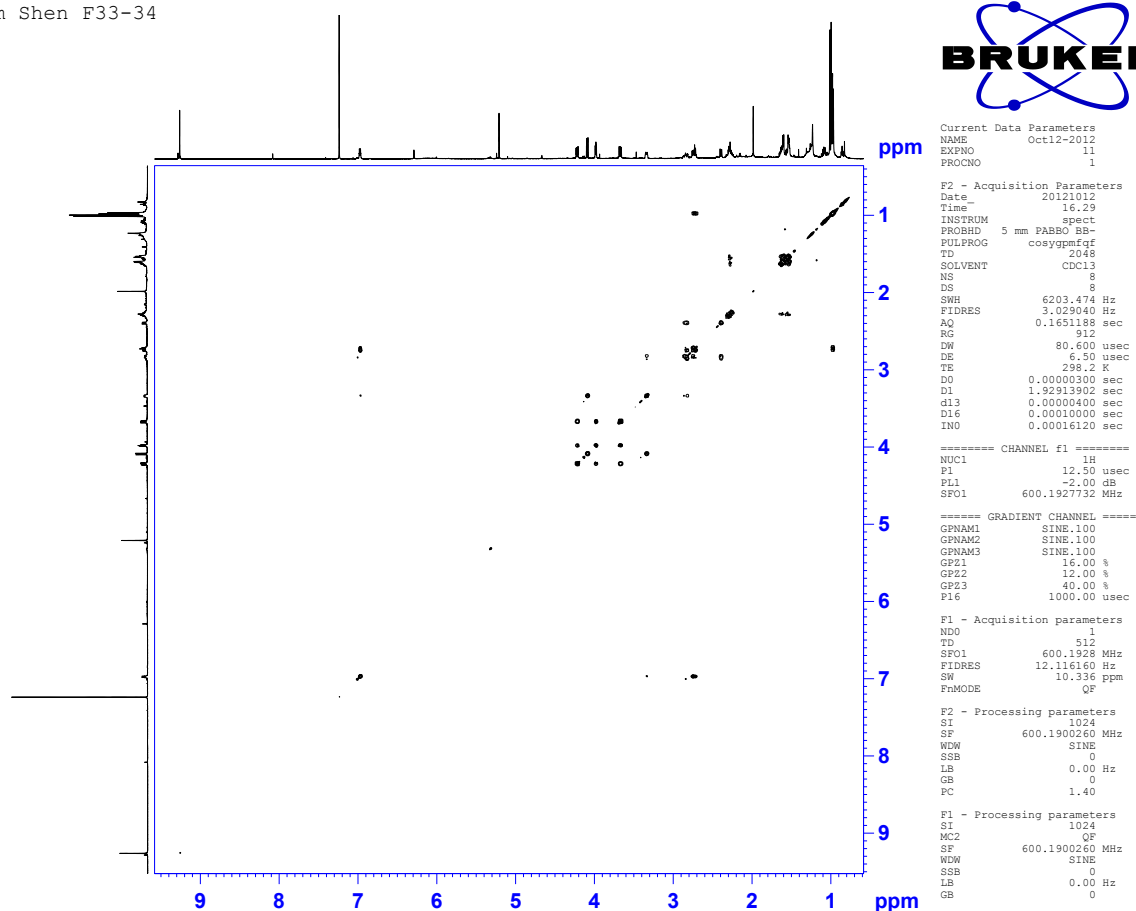


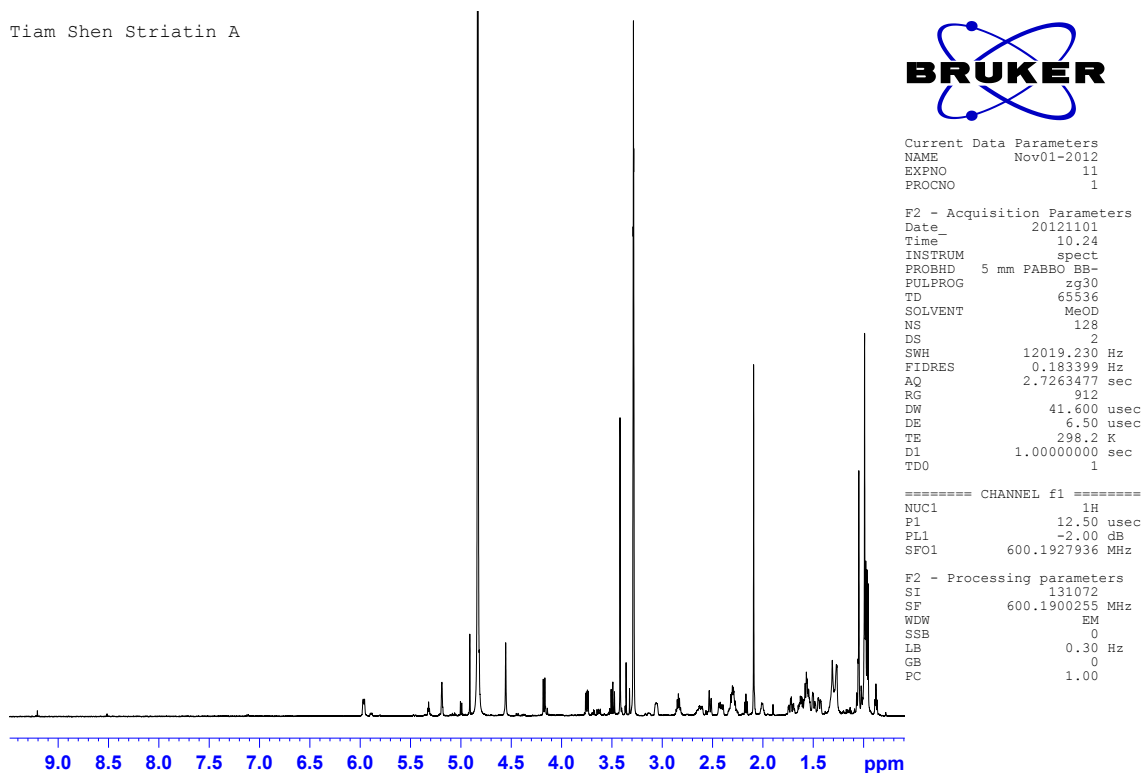
Abbildung 7.12: Striatin D, COSY.

**Striatin A:**

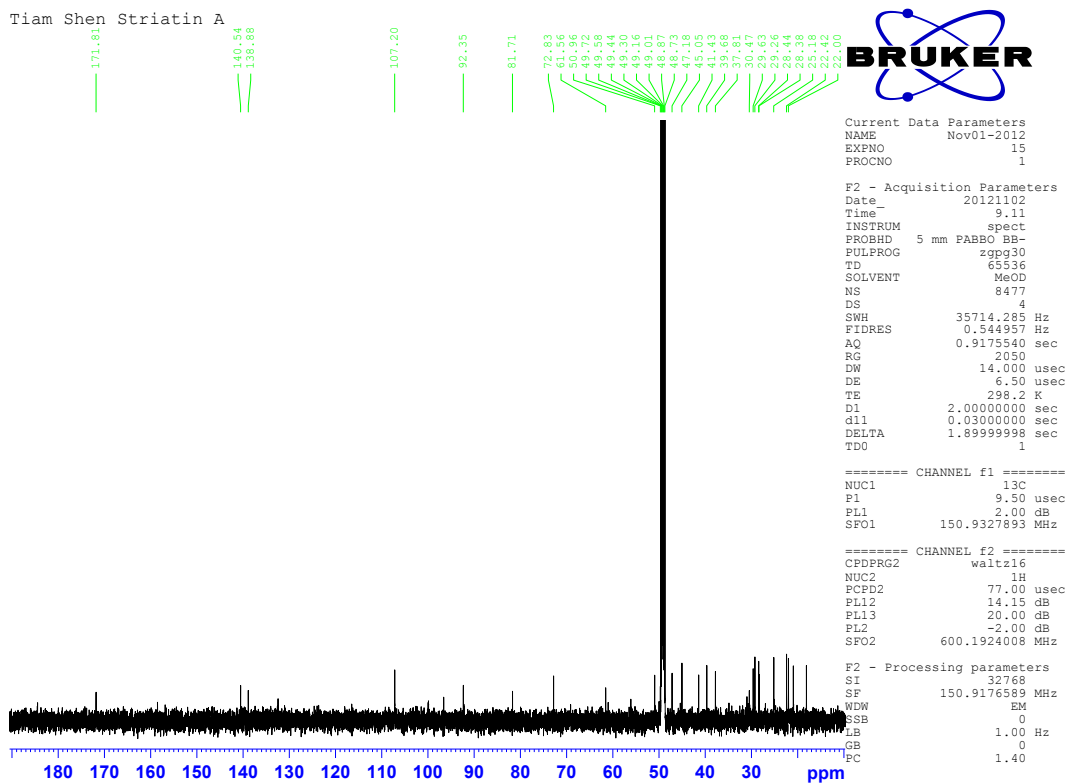
$^1\text{H}$  NMR (MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm): 0.975 ( $\text{CH}_3$ , d, 19,20-H), 0.999 ( $\text{CH}_3$ , d, 19,20-H), 1.005 ( $\text{CH}_3$ , s, 16-H), 1.062 ( $\text{CH}_3$ , s, 17-H), 1.444 – 1.740 ( $\text{CH}_2$ , 7-H), 1.510 – 1.569 ( $\text{CH}_2$ , 8-H), 1.566 – 1.632 ( $\text{CH}_2$ , 1-H), 2.108 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ , s), 2.318 ( $\text{CH}_2$ , 2-H), 2.425 – 2.636 ( $\text{CH}_2$ , 10-H), 2.539 (CH, 5-H), 2.857 (CH, sept, 18-H), 3.075 (CH, 13-H), 3.434 ( $\text{OCH}_3$ , s), 3.505 – 3.763 ( $\text{CH}_2$ , 5'-H), 4.190 (CH, 14-H), 4.848 (CH, 4'-H), 4.926 (CH, 1'-H), 5.204 (CH, 15-H), 5.982 (CH, 11-H)

$^{13}\text{C}$  NMR (MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm): 18.1 ( $\text{CH}_3$ , C-16), 21.0 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 22.1 ( $\text{CH}_3$ , C-19 oder C-20), 22.4 ( $\text{CH}_3$ , C-19 oder C-20), 25.2 ( $\text{CH}_3$ , C-17), 28.4 (CH, C-18), 28.5 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 29.3 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 29.6 ( $\text{CH}_2$ , C-10), 37.9 ( $\text{CH}_2$ , C-8), 39.7 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 41.5 (C-q, C-6), 45.1 (CH, C-5), 47.2 (CH, C-3), 50.9 (C-q, C-9), 55.6 ( $\text{OCH}_3$ ), 61.6 ( $\text{CH}_2$ , C-5'), 72.9 (CH, C-4'), 81.8 (C-q, C-2'), 91.4 (CH, C-14), 96.6 (C-q, C-3'), 99.9 (CH, C-15), 107.2 (CH, C-1'), 132.3 (CH, C-11), 134.0 (C-q, C-12), 138.9 (C-q, C-4), 140.6 (C-q, C-3), 171.9 (C-q,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ )

Tiam Shen Striatin A

Abbildung 7.13: Striatin A,  $^1\text{H}$ .

Tiam Shen Striatin A

Abbildung 7.14: Striatin A,  $^{13}\text{C}$ .

Tiam Shen Striatin A

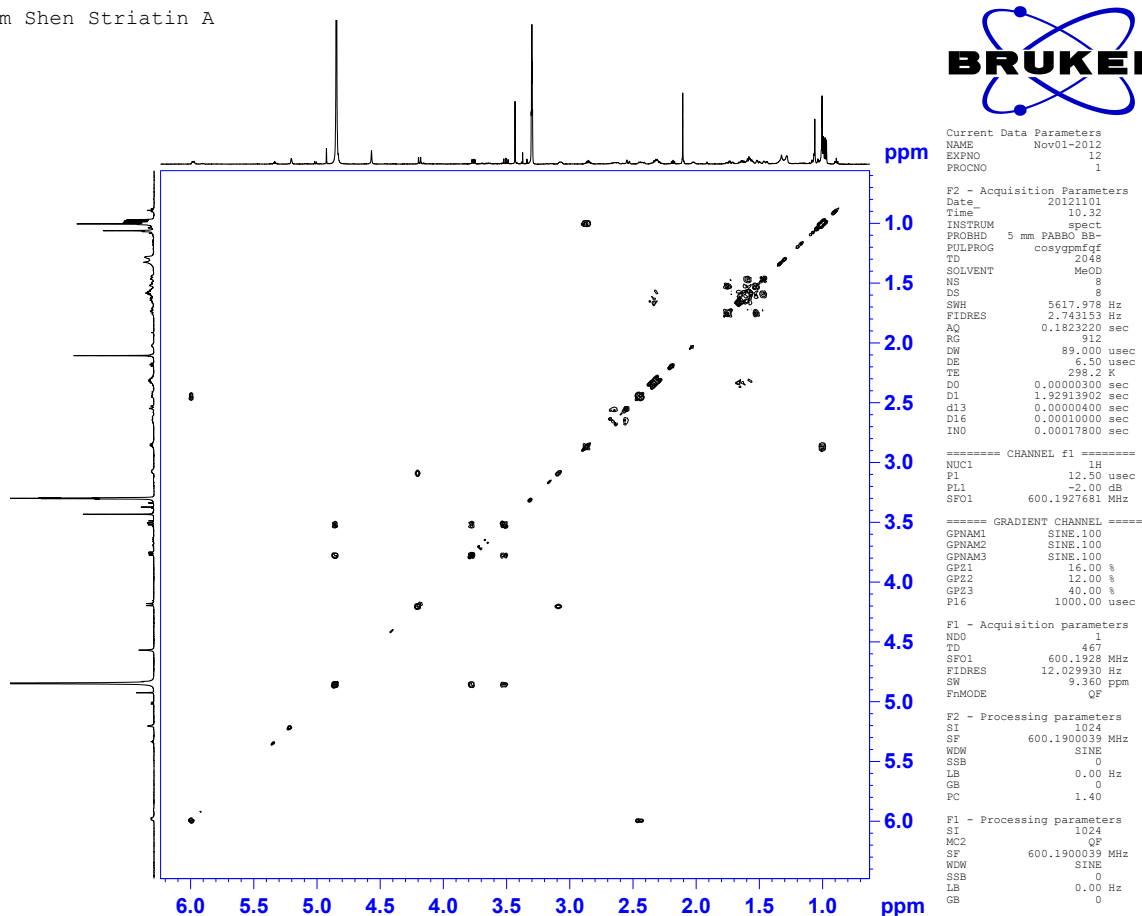
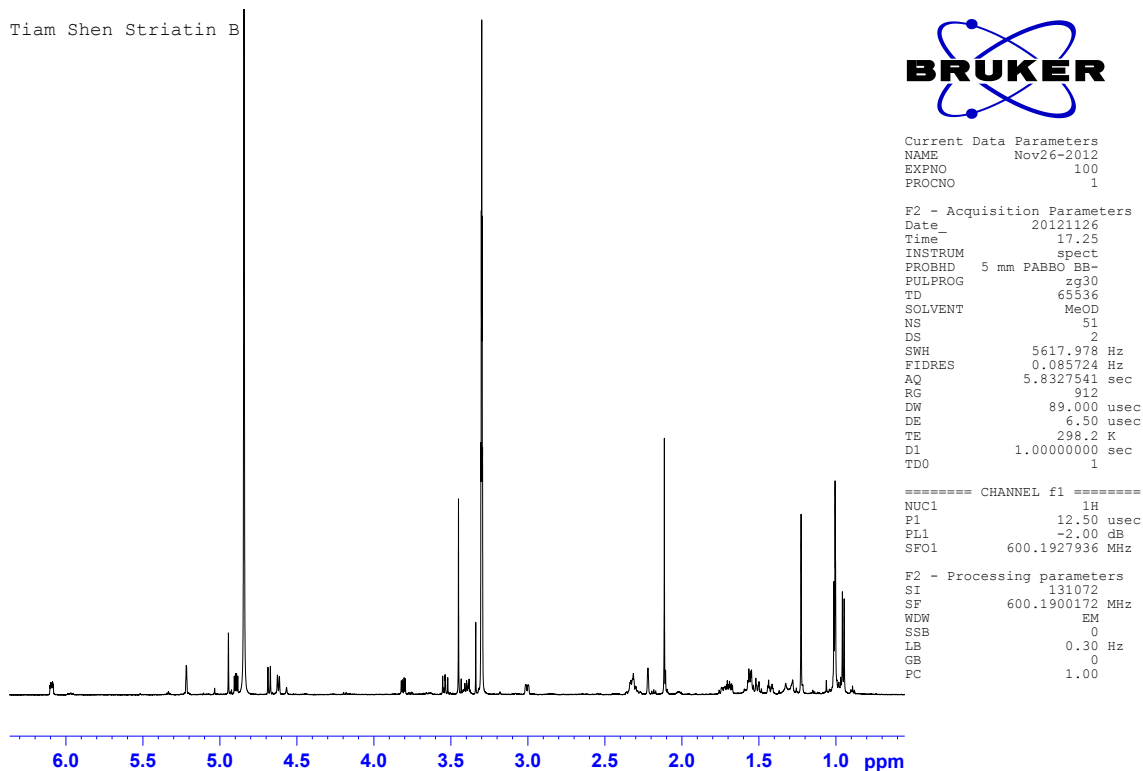
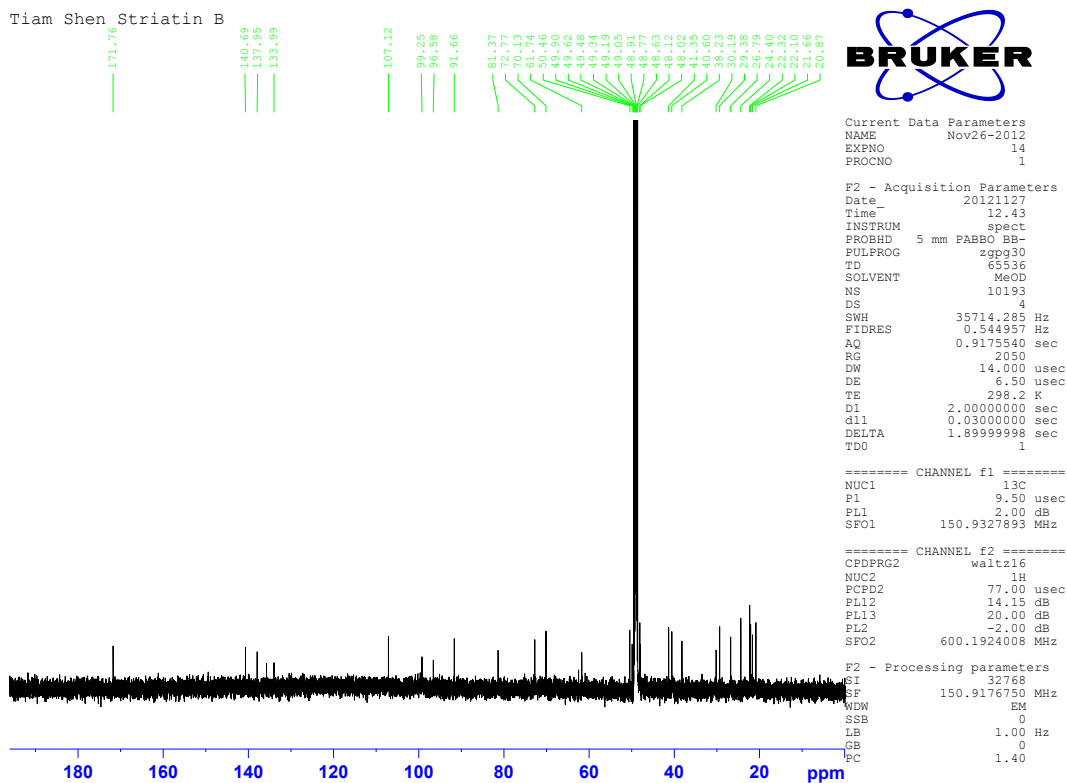


Abbildung 7.15: Striatin A, COSY.

**Striatin B:**

$^1\text{H}$  NMR (MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm): 0.952 (CH<sub>3</sub>, d, 19,20-H), 1.006 (CH<sub>3</sub>, s, 17-H), 1.007 (CH<sub>3</sub>, d, 19,20-H), 1.224 (CH<sub>3</sub>, s, 16-H), 1.428 – 1.732 (CH<sub>2</sub>, 7-H), 1.511 – 1.693 (CH<sub>2</sub>, 1-H), 1.558 (CH<sub>2</sub>, 8-H), 2.114 (COCH<sub>3</sub>, s), 2.221 (OCH<sub>3</sub>, s), 2.315 (CH<sub>2</sub>, 2-H), 3.006 (CH, 5-H), 3.341 (CH, 13-H), 3.392 (CH, 18-H), 3.537 – 3.811 (CH<sub>2</sub>, 5'-H), 4.621 (CH, 10-H), 4.680 (CH, 14-H), 4.897 (CH, 4'-H), 4.944 (CH, 1'-H), 5.218 (CH, 15-H), 6.093 (CH, 11-H)

$^{13}\text{C}$  NMR (MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm): 20.9 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>), 21.7 (CH<sub>3</sub>, C-16), 22.1 (CH<sub>3</sub>, C-19 oder C-20), 22.4 (CH<sub>3</sub>, C-19 oder C-20), 24.4 (CH<sub>3</sub>, C-17), 26.8 (CH, C-18), 29.4 (CH<sub>2</sub>, C-2), 30.2 (CH<sub>2</sub>, C-7), 38.2 (CH<sub>2</sub>, C-8), 40.6 (CH<sub>2</sub>, C-1), 41.4 (C-q, C-6), 48.0 (CH, C-5), 48.1 (OCH<sub>3</sub>), 49.9 (CH, C-13), 50.5 (C-q, C-9), 61.7 (CH<sub>2</sub>, C-5'), 70.2 (CH, C-10), 72.8 (CH, C-4'), 81.4 (C-q, C-2'), 91.5 (CH, C-14), 96.8 (C-q, C-3'), 99.2 (CH, C-15), 107.1 (CH, C-1'), 134.0 (CH, C-11), 135.9 (C-q, C-12), 138.0 (C-q, C-4), 140.9 (C-q, C-3), 171.8 (C-q, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)

Abbildung 7.16: Striatin B,  $^1\text{H}$ .Abbildung 7.17: Striatin B,  $^{13}\text{C}$ .

Tiam Shen Striatin B

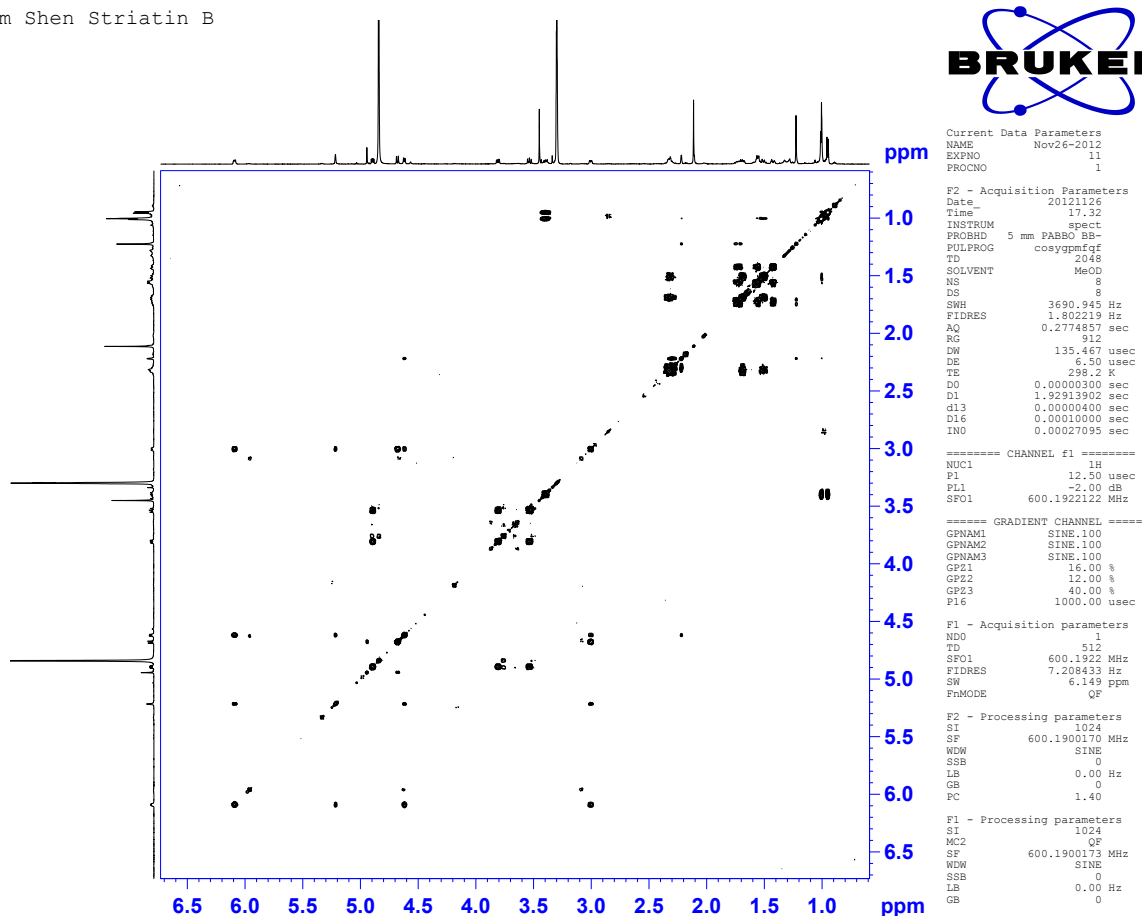
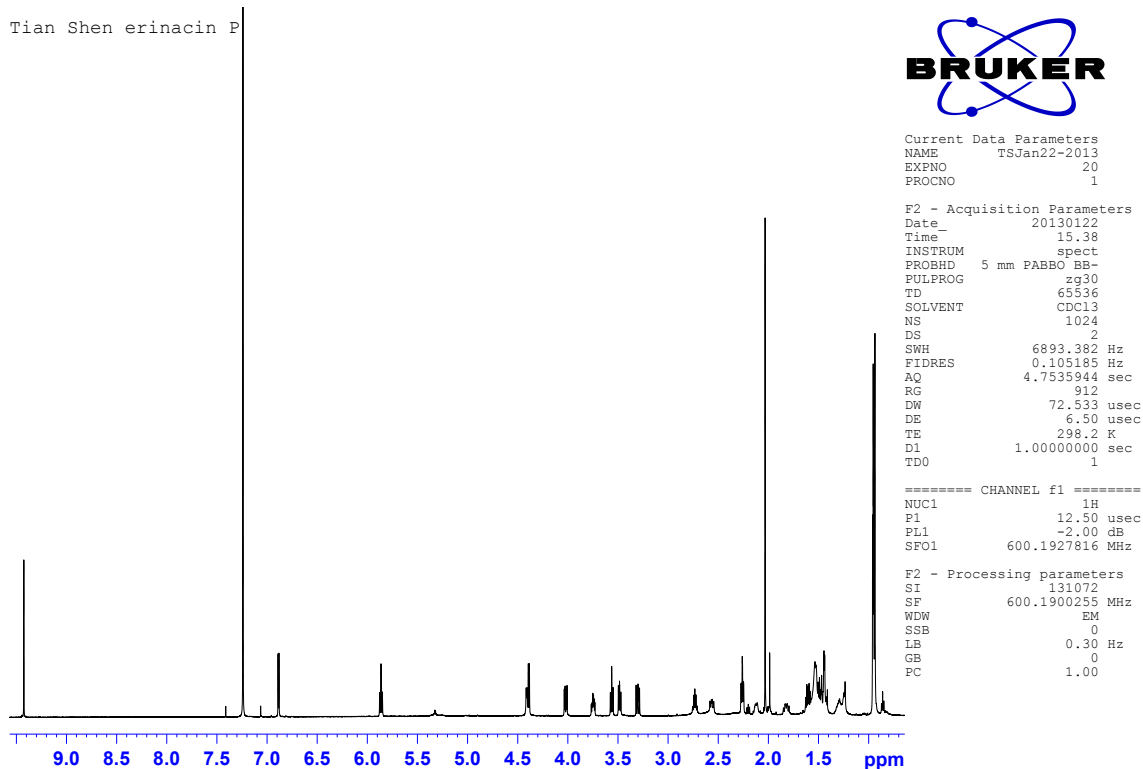
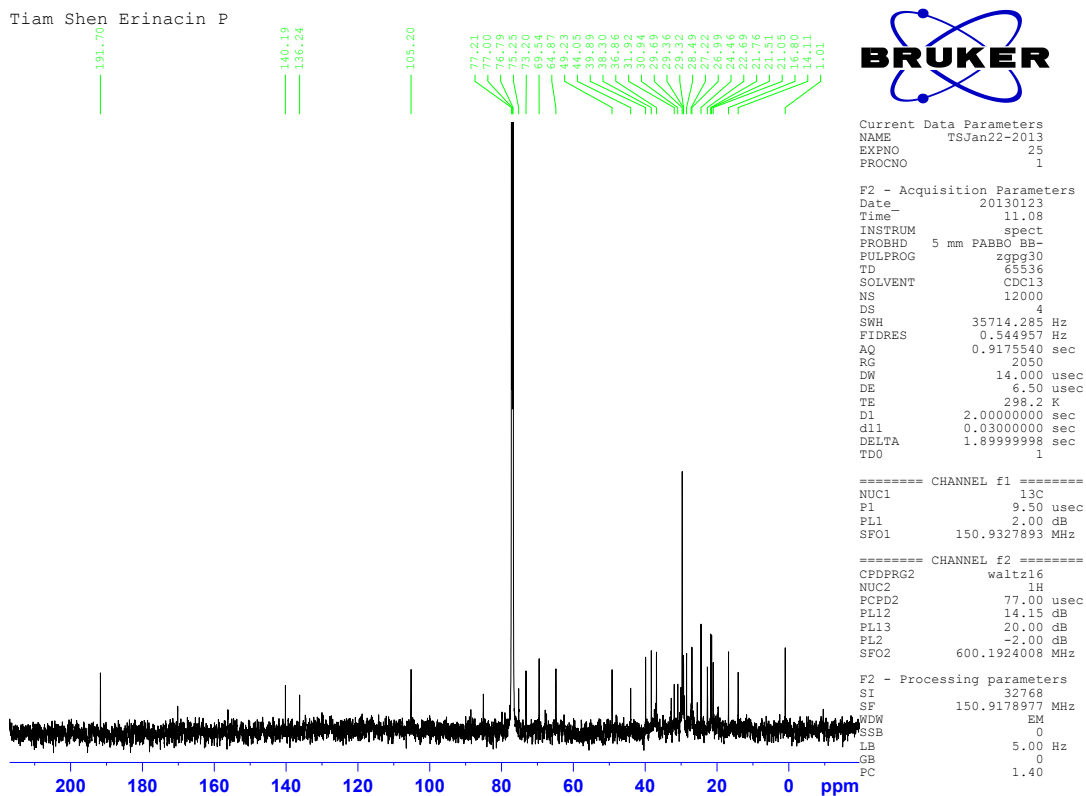


Abbildung 7.18: Striatin B, COSY.

**Erinacin P:**

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 0.931 ( $\text{CH}_3$ , 17-H), 0.937 ( $\text{CH}_3$ , 19,20-H), 0.943 ( $\text{CH}_3$ , s, 16-H), 1.426 ( $\text{CH}_2$ , 8-H), 1.443 – 1.531 ( $\text{CH}_2$ , 7-H), 1.605 – 1.626 ( $\text{CH}_2$ , 1-H), 1.824 – 2.564 ( $\text{CH}_2$ , H-10), 2.024 ( $\text{COCH}_3$ , s), 2.124 (CH, 5-H), 2.261 ( $\text{CH}_2$ , 2-H), 2.734 (CH, 18-H), 3.304 – 4.023 ( $\text{CH}_2$ , 5'-H), 3.486 (CH, 2'-H), 3.566 (CH, 3'-H), 3.749 (CH, 4'-H), 4.39 (CH, 1'-H), 4.41 (CH, 14-H), 5.863 (CH, 11-H), 6.886 (CH, 13-H), 9.426 (CHO, 15-H)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 16.9 ( $\text{CH}_3$ , C-16), 21.1 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 21.5 ( $\text{CH}_3$ , C-19 oder C-20), 21.8 ( $\text{CH}_3$ , C-19 oder C-20), 24.5 ( $\text{CH}_3$ , C-17), 26.9 (CH, C-18), 28.4 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 29.4 ( $\text{CH}_2$ , C-10), 30.9 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 36.9 ( $\text{CH}_2$ , C-8), 38.3 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 39.9 (CH, C-5), 44.1 (C-q, C-6), 49.2 (C-q, C-9), 64.9 ( $\text{CH}_2$ , C-5'), 69.5 (CH, C-4'), 73.3 (CH, C-2'), 75.3 (CH, C-3'), 85.1 (CH, C-14), 105.3 (CH, C-1'), 134.7 (C-q, C-4), 136.4 (C-q, C-12), 138.0 (C-q, C-4), 140.2 (C-q, C-3), 156.2 (CH, C-13), 170.4 (C-q,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 191.7 (CHO, C-15)

Abbildung 7.19: Erinacin P,  $^1\text{H}$ .Abbildung 7.20: Erinacin P,  $^{13}\text{C}$ .

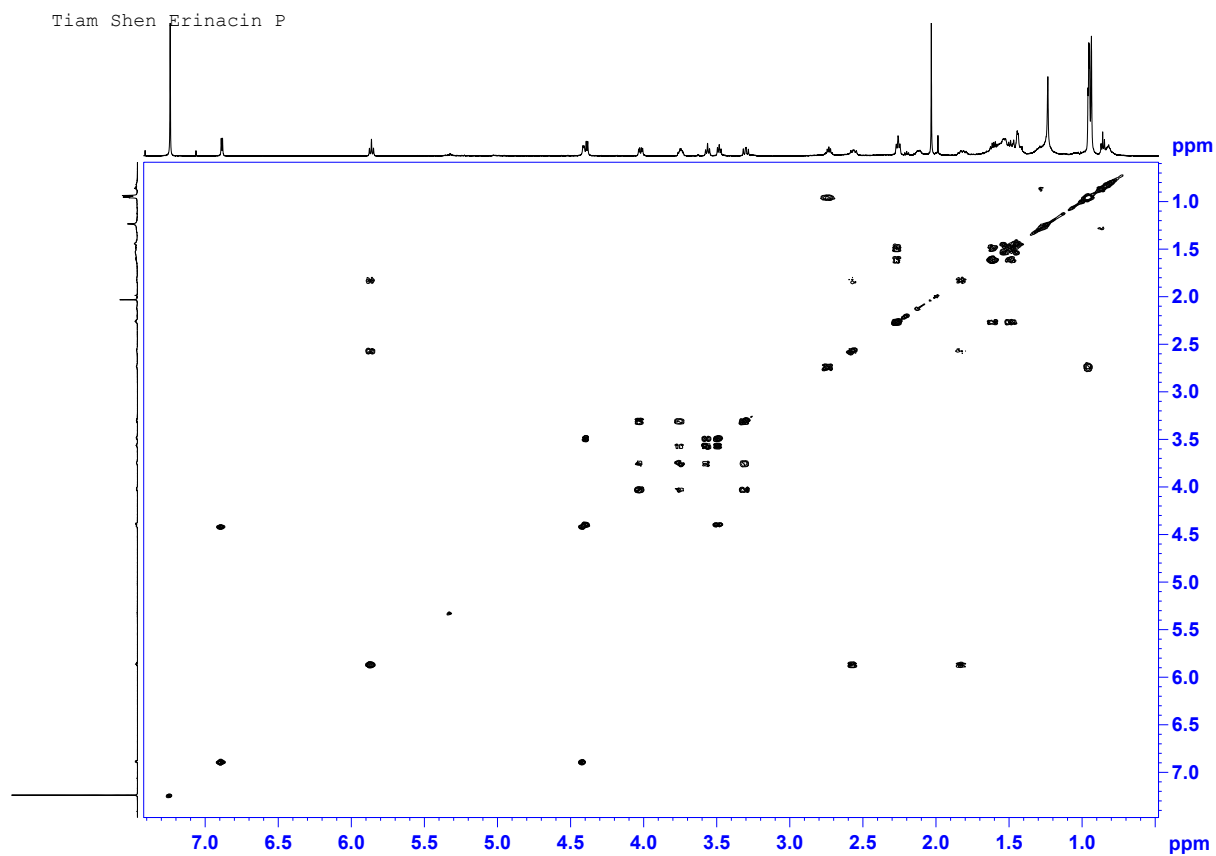


Abbildung 7.21: Erinacin P, COSY.

## 7.2 HPLC-Chromatogramme

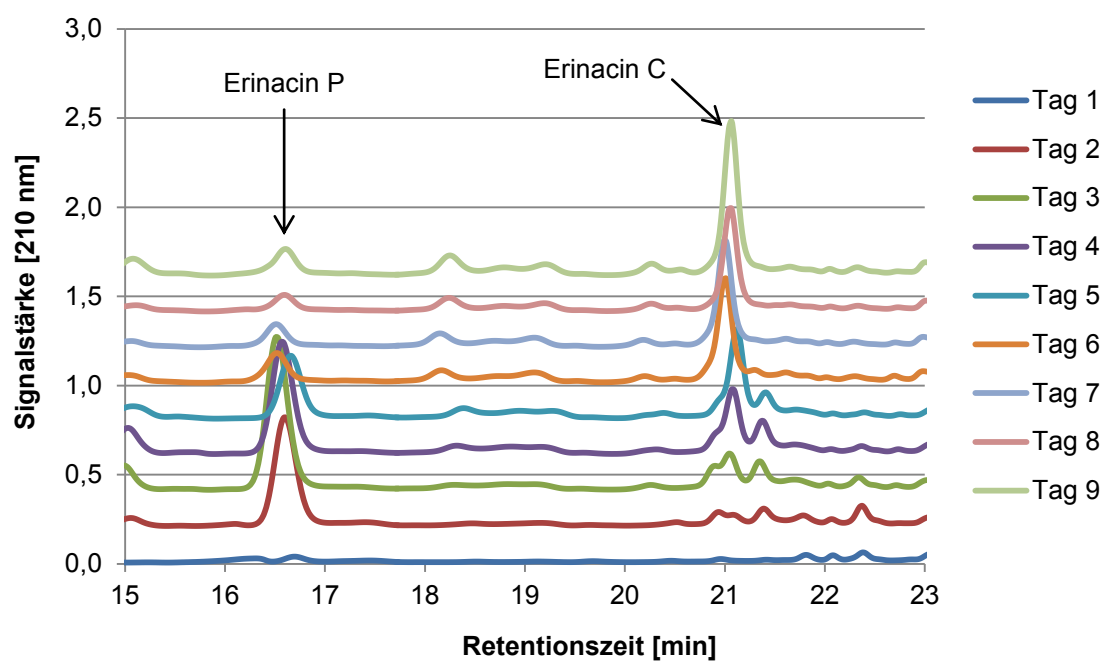


Abbildung 7.22: HPLC-Chromatogramme (Offset 20%) zur Produktbildungskinetik. Ethylacetat-Rohextrakte aus Kulturüberständen von *H. erinaceus* (Tag 1 bis Tag 9).